

# **AUTOREFERAT**

**dr n. wet. Piotr Brodzki**

**KATEDRA I KLINIKA ROZRODU ZWIERZĄT  
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ  
UNIwersYTET PRZYRODnicZY W LUBLINIE**

**Lublin 2015**

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i nazwisko

Piotr Brodzki

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie rok 2004, tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ wybranych leków stosowanych w terapii nowotworów na behavior seksualny, wartość biologiczną nasienia oraz niektóre parametry odporności u psów.
- tytuł: specjalista krajowy z zakresu Rozród Zwierząt, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy, rok 2002
- tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, Lublin 1998.

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

Od roku 1998 do dnia dzisiejszego - najpierw Akademia Rolnicza, a następnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie na stanowiskach:

1. od 01.10.1998 - do 30.06.2004 - Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, AR w Lublinie, asystent
2. od 01.10.2004 do dnia dzisiejszego - Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, UP w Lublinie, adiunkt

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

4.1. Jednotematyczny cykl publikacji:

**Badania nad zastosowaniem wybranych parametrów oceny układu immunologicznego w diagnostyce podklinicznych stanów zapalnych macicy, w aspekcie wykorzystania ich w profilaktyce i terapii *endometritis* u krów mlecznych**

**publikacje:**

**4.1.1. Brodzki P**, Niemczuk K, Kostro K, Brodzki A, Kurek Ł, Marczuk J. Cytological evaluation of inflammation of the uterus and influence of endometritis on selected reproductive parameters in dairy cows. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2014, 58, 235-242 (Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 15, IF<sub>2014</sub> = 0.357).

**Wkład w autorstwo: 80%** - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, udział w opracowaniu metody badawczej, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników badań, pisanie ostatecznej wersji manuskryptu.

**4.1.2. Brodzki P**, Kostro K, Brodzki A, Lisiecka U, Kurek Ł, Marczuk J. Phenotyping of leukocytes and granulocyte and monocyte phagocytic activity in the peripheral blood and uterus of cows with endometritis. Theriogenology 2014, 82, 403-410 (Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 30, IF<sub>2014</sub> = 1.798).

**Wkład w autorstwo: 70%** - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, udział w opracowaniu metody badawczej, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników badań, pisanie ostatecznej wersji manuskryptu.

**4.1.3. Brodzki P**, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek Ł. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. Theriogenology 2015, 84, 11-18 (Punkty MNiSzW<sub>2015\*</sub> 30, IF<sub>2015\*</sub> = 1.798).

**Wkład w autorstwo: 70%** - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników badań, pisanie ostatecznej wersji manuskryptu.

**4.1.4. Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Lisiecka U.** Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science* 2014, 148, 109-114 (Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 30, IF<sub>2014</sub> = 1.511).

**Wkład w autorstwo: 80%** - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, udział w opracowaniu metody badawczej, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników badań, pisanie ostatecznej wersji manuskryptu.

**4.1.5. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J.** Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Veterinary Research Communications* 2015, 39, 143-149 (Punkty MNiSzW<sub>2015\*</sub> 25, IF<sub>2015\*</sub> = 1.236).

**Wkład w autorstwo: 80%** - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników badań, pisanie ostatecznej wersji manuskryptu.

**Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:**

– wg listy czasopism punktowanych MNiSzW – **130 pkt**

– summaryczny Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR) – **6.700**

**Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstaniu pracy znajdują się w załączeniu**

\* W przypadku prac przyjętych do druku lub, które ukazały się drukiem w roku 2015 punkty MNiSzW oraz wartość IF podano za rok 2014

## 4.2. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Zaburzenia płodności w stadach krów mlecznych stanowią jeden z podstawowych czynników ograniczających wysoką efektywność chowu i hodowli tego gatunku zwierząt. Mogą one wynikać z wielu przyczyn, a rozpoznanie ich nie zawsze jest możliwe, pomimo wykorzystania wielu metod diagnostycznych jednocześnie. Jedną z najczęstszych przyczyn prowadzącą do zaburzeń płodności, są stany zapalne błony śluzowej macicy. *Endometritis* stanowi jeden z najpoważniejszych problemów ekonomicznych w hodowli bydła mlecznego na całym świecie. Największe straty przynoszą koszty leczenia *endometritis*, wielokrotnego nieskutecznego sztucznego unasieniania (wysoki indeks inseminacyjny), a często nawet konieczność brakowania zwierząt ze stada, w wyniku niepłodności (50, 81). Stan zapalny macicy może powodować upośledzenie funkcji endometrialnych, co uniemożliwia zapłodnienie, implantację zarodka a nawet może prowadzić do wczesnych poronień (24, 26, 49, 50, 51). Ponadto zapalenie błony śluzowej macicy, może być przyczyną zaburzeń cyklu jajnikowego, obejmujących tworzenie się torbieli jajnikowych, przedłużenie fazy lutealnej oraz opóźnione pojawienie się pierwszej pełnowartościowej rui po porodzie. W konsekwencji wydłuża się okres potrzebny do powrotu prawidłowej aktywności jajników, a tym samym występuje pogorszenie parametrów rozrodu (31, 81, 88). Dostępne publikacje wskazują, że występowanie stanów zapalnych macicy jest ściśle związane z okresem poporodowym, a pojawiające się w tym czasie zakażenia układu rozrodczego, mogą przenosić się poza okres poporodowy i być przyczyną obniżonej płodności krów (3, 18, 23, 38, 48).

Poporodowa inwolucja macicy u krów trwa dość długo i można ją podzielić na dwa etapy. Pierwszy, w którym macica powraca do wielkości z przed ciąży, trwa do 21-25 dnia po porodzie i nazywany jest okresem poporodowym. W tym czasie kończy się tzw. kliniczny okres poporodowy. W drugim okresie, który może trwać do sześciu tygodni, a według Sheldon i wsp. (79) nawet do 8 tygodni po porodzie, dochodzi do histologicznego powrotu macicy do stanu z przed ciąży i kończy się całkowitą inwolucją macicy. Proces inwolucji jest uzależniony od wielu czynników i może zostać zaburzony, co predysponuje macicę do zakażeń. Atonia lub hipotonia macicy może być spowodowana ciężkim porodem, ciążą bliźniaczą, martwym płodem lub zatrzymaniem łożyska. Może być także efektem zaburzeń ogólnoustrojowych jak ujemny bilans energetyczny oraz niedobory mineralno - witaminowe (27, 79, 81). Wynikiem pogłębiających się po porodzie niedoborów, jest reakcja stresowa z wytworzeniem mediatorów stresu, zwłaszcza kortykosterydów i adrenaliny. Aminy katecholowe działając na receptory  $\beta$ -adrenergiczne wywołują atonię lub hipotonię macicy. Nadmiar kortykosterydów wpływa hamująco na odporność organizmu i ma również zasadniczy wpływ na rozwój zakażeń macicy (27, 80). Po zakończeniu okresu poporodowego, od 6 tygodnia po porodzie uznaje się jamę macicy za

wolną od czynników zakaźnych. Wprawdzie podczas trwania rui w wyniku otwarcia szyjki macicy dochodzi do przejściowego zasiedlenia macicy drobnoustrojami, jednak zazwyczaj nie rozwija się zakażenie, ponieważ czynniki zakaźne są szybko unieszkodliwiane i usuwane przez mechanizmy obronne organizmu.

Zakażenia poporodowe mogą utrzymywać się bardzo długo po porodzie w postaci *endometritis* i przebiegać w formie klinicznej lub podklinicznej. *Endometritis clinica*, charakteryzuje się obecnością ropnego wypływu z dróg rodnych (zawartość ropy w wypływie powyżej 50%) występującym po 21 dniu po porodzie, bądź śluzowo-ropnego wypływu (50% ropy, 50% śluzu) po 26 dniu po porodzie oraz powiększeniem rozmiarów szyjki macicy >7,5 cm, bez występowania ogólnoustrojowych objawów klinicznych (46, 47, 79).

*Endometritis subclinica*, charakteryzuje się brakiem wypływów z dróg rodnych, a nawet brakiem ropnej wydzieliny w pochwie, stan zapalny macicy manifestuje się jedynie podwyższoną liczbą leukocytów w jamie macicy, widoczną w badaniu cytologicznym (11, 18, 79). Ze względu na to, że liczba leukocytów w macicy u krów jest zależna od okresu laktacji i zmienia się stopniowo wraz z upływem czasu od porodu, o stanie zapalnym świadczy określona liczba neutrofilii (komórek polimorfonuklearnych - PMN), dla określonego okresu po porodzie. Według Kasimanickam i wsp. (38, 39) oraz Sheldon i wsp. (79, 81) o *endometritis subclinica* świadczy powyżej 18% PMN pomiędzy 21 a 33 dniem po porodzie, oraz powyżej 10% PMN pomiędzy 34 a 47 dniem po porodzie. Według Dubuc i wsp. 2010 (15), o *endometritis* (bez znaczenia czy występują wypływy czy nie) mówimy, jeżeli liczba PMN w 35±3 dniu po porodzie będzie wynosiła powyżej 6%, a w 56±3 dniu po porodzie będzie przekraczać 4%. Barlund i wsp. (6), uważa, że 8% PMN stanowi wartość progową dla potwierdzenia *endometritis* i takiej wartości użył w swoich badaniach u krów w 150 dniu po porodzie. Gilbert i wsp. (25), w swoich badaniach charakteryzuje *endometritis* w 40 - 60 dniu po porodzie, jako podwyższoną liczbę PMN powyżej 5%. W związku z tym, że *endometritis subclinica* ma przebieg bezobjawowy, rozpoznawane jest zazwyczaj bardzo późno, najczęściej po kilku nieskutecznych inseminacjach. Brak odpowiednio wczesnej diagnozy, opóźnia wprowadzenie postępowania leczniczego, a brak ciąży, pomimo wykonywanych zabiegów inseminacji, pogarsza parametry rozrodu w stadzie.

W złożonej etiologii *endometritis* ważną rolę odgrywają infekcje bakteryjne. Najczęściej izolowanymi patogenami z macicy krów z *metritis* i *endometritis* są *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), oraz *Prevotella melaninogenicus* (*P. melaninogenicus*) (9, 18, 23, 34). Uważa się, że *E. coli* jest najwcześniej po porodzie pojawiającą się patogenną bakterią i pełni rolę promotora dla zakażeń *T. pyogenes* w późniejszym okresie po porodzie (25). Uważa się również, że cztery najczęściej występujące patogeny *T. pyogenes*, *E. coli*, *F. necrophorum* i *P. melaninogenicus* mogą działać synergistycznie w

wywoływaniu *endometritis* (25, 87). W etiopatogenezie zakażeń bakteryjnych macicy pojawia się również fakt współdziałania *T. pyogenes* z *F. necrophorum* oraz *Prevotella spp.*, co zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia stanów zapalnych macicy oraz nasila objawy chorobowe (62, 69). Ustalono ponadto, że *T. pyogenes* wytwarza substancję zwaną czynnikiem wzrostu dla *F. necrophorum* (81). Wymienione bakterie beztlenowe mają zdolności wytwarzania substancji osłabiających mechanizmy lokalnej odporności macicy, *F. necrophorum* wytwarza leukotoksynę zaburzającą funkcje leukocytów a *P. melaninogenicus* substancję hamującą fagocytozę, przez co ułatwia rozwój zakażeń (59, 78). Ponadto większość drobnoustrojów może również ulegać mutacjom, co związane jest ze zmianą ich części składowych i osłabia wykrywanie patogenów przez komórki układu immunologicznego, dzięki czemu patogeny mogą wywoływać nawracające infekcje. W strukturze drobnoustrojów istnieją jednak cząsteczki, które muszą pozostać niezmienione, ponieważ są niezbędne do ich przeżycia np. części błony komórkowej lub kwasów nukleinowych. Są to grupowe struktury drobnoustrojów znane, jako PAMPs (pathogen associated molecular patterns) (58, 82). PAMPs są rozpoznawane przez wyspecjalizowaną grupę receptorów odporności nieswoistej określanych, jako receptory rozpoznające wzorce (pattern recognition receptors PRRs). Rozpoznano i opisano kilka grup tych receptorów a klasycznym i najlepiej poznanym w macicy przykładem są receptory Toll podobne (Toll-like receptors TLR) (8, 82). Obecność receptorów TLR jest uwarunkowana genetycznie, a w chwili obecnej u krów, znanych i opisanych jest 10 receptorów tego typu, od TLR1 do TLR10, z których każdy może rozpoznawać inną składową komórki patogenu (74, 81, 85). Receptory TLR umożliwiają również komórkom układu immunologicznego odróżnianie antygenów własnych od antygenów obcych. Komórki wrodzonego systemu odporności macicy u krów, takie jak komórki nabłonka endometrium, makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty NK posiadają receptory TLR, co umożliwia szybkie rozpoznanie czynnika infekcyjnego i uruchomienie mechanizmów prowadzących do jego usunięcia. Aktywowane komórki odporności nieswoistej uwalniają cytokiny prozapalne, chemokiny i defensyny, których zadaniem jest pomoc w zwalczaniu zakażenia, chemotaksja aktywnych komórek odpornościowych (neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne) oraz aktywacja swoistej odpowiedzi immunologicznej. Ponadto pobudzenie receptorów TLR na powierzchni makrofagów prowadzi zarówno do wzmożonej syntezy cytokin prozapalnych, interleukin 1, 6, 8 oraz TNF- $\alpha$ , ale również zwiększa ich zdolności fagocytarne oraz powoduje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu i syntezę tlenku azotu (81, 82, 89). Odporność nabyta polega na ekspansji różnych subpopulacji limfocytów, skierowanych przeciw patogenom. Jest to proces wysoce efektywny i o dużej swoistości, ale do pełnego rozwoju potrzebuje nawet kilku dni. Prezentacja antygeny limfocytom, a następnie ich selekcja klonalna, prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi i wytworzenia swoistych przeciwciał. W przypadku infekcji, wszystkie charakterystyczne objawy stanu zapalnego (przekrwienie, obrzęk, ból, utrata prawidłowych

czynności) są zapoczątkowywane przez odporność wrodzoną. Komórki odporności swoistej mogą wspierać i zaostreć te efekty, jednak zasadniczy sygnał, który rozpoczyna i ostatecznie decyduje o odpowiedzi uzależniony jest od identyfikacji patogenu przez elementy odpowiedzi nieswoistej (8, 81, 80).

W patogenezie stanów zapalnych macicy u krów należy również brać pod uwagę występowanie zapalenia bez wykrycia drobnoustrojów. W dostępnej literaturze można odnaleźć prace opisujące podwyższoną liczbę neutrofilii świadczącą o stanie zapalnym, która nie była poparta obecnością bakterii w badaniu bakteriologicznym (5, 57). Nie wiadomo, jaka może być przyczyna powstawania i utrzymywania się stanu zapalnego bez potwierdzenia obecności patogenów. Jedynie Sheldon i wsp. (81) sugeruje, że stan taki może utrzymywać się różnie długo po wyeliminowaniu patogenów z macicy, w wyniku rozregulowania wydzielania prostaglandyn. Badania przeprowadzone przez Gabler i wsp. (19) potwierdzają tę teorię i jednocześnie zwracają uwagę, że ilość produkowanej wewnątrzkomórkowo PGE<sub>2</sub> w komórkach endometrium, jest mniejsza u krów z *endometritis* niż u krów zdrowych. Autorzy ci uważają, że zaburzenie wydzielania PGE<sub>2</sub> lub niedobór cyclooxygenazy (COX), w stanach zapalnych macicy, może być nawet przyczyną wczesnej zamieralności zarodków. Według autorów poza interferonem tau, obecność PGE<sub>2</sub> jest również warunkiem niezbędnym do rozwoju zapłodnionej komórki jajowej u krów, poprzez ochronę rozwijającego się ciałka żółtego. Dlatego też, stosunek PGE<sub>2</sub> do PGF<sub>2α</sub> podczas późnej fazy lutealnej, uznaje się za bardziej istotne, niż ich bezwzględne stężenia (60, 64). Ustalenia te prowadzą do hipotezy, że zaobserwowany niższy poziom PGE<sub>2</sub> wydzielanej lokalnie w macicy, może zakłócić embrionalny prostaglandynowy szlak sygnałowy. Teoria ta wymaga dodatkowych badań jednak pozwala wyjaśniać, dlaczego krowy z subkliniczną postacią *endometritis* wykazują zaburzenia zdolności rozrodczej.

Uznaje się, że sprawna odporność przeciwwakaźna macicy ma podstawowe znaczenie zarówno w eliminacji czynnika zakaźnego, jak również w hamowaniu zapalnych zmian destrukcyjnych macicy (7, 14, 29, 74, 81). Wszystkie mechanizmy miejscowej odporności macicy nie są do chwili obecnej w pełni poznane, zwłaszcza stan odporności podczas występujących procesów zapalnych. Wiadomo jedynie, że osłabiona miejscowa odporność macicy ma decydujący wpływ na rozwój i utrzymywanie się stanów zapalnych *endometrium*. Proces fagocytozy w różnych stanach patologicznych może zostać zaburzony, nie wiadomo jednak, czy rozwój stanów zapalnych może mieć bezpośredni związek z tym mechanizmem odporności. Ponadto nieznanne są również, rodzaje komórek immunologicznie kompetentnych poza fagocytami, które biorą bezpośredni udział w likwidacji zakażenia oraz jak zmienia się ich rola w stanach zapalnych, a także jak przebiegają procesy immunoregulacyjne w macicy. W badaniach przeprowadzonych przez Mateus i wsp. (55) przy użyciu cytometrii przepływowej ocenione zostały komórki fagocytujące, w wypłuczynach z macicy krów, w okresie poporodowym. Autorzy ustalili,



że zarówno wartości indeksu fagocytarnego jak i liczby komórek fagocytyujących w pierwszych 2 tygodniach po porodzie były na wysokim poziomie, a 2,5 i 3 tygodnie po porodzie obniżyły się. Wzrost wartości po porodzie autorzy tłumaczą obecnością dużej liczby bakterii oraz cząstek stymulujących aktywność komórek fagocytyujących, wraz z malejącą ilością zanieczyszczeń, aktywność ich również obniża się. Zastosowanie cytometrii przepływowej do badania wypłuczyn z macicy w celu oceny lokalnych mechanizmów immunologicznych, wydaje się być bardzo istotne w diagnostyce klinicznej. W badaniach tych możliwa jest ocena komórek bezpośrednio biorących udział w miejscowej odporności, obecnych wewnątrz macicy. Z danych przedstawionych przez Park i wsp. (65, 66) oraz Shafer-Weaver i Sordillo (75) wynika, że rodzaj leukocytów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej ma decydujące znaczenie w reaktywności komórek zwalczających patogeny. Autorzy ci stwierdzili, że u krów podatnych na stany zapalne wymienia zarówno w krwi, jak i w wydzielinie wymienia poziom limfocytów TCD8+ (cytotoxic/supressor), jest wyższy niż limfocytów TCD4+ (helpers), w przeciwieństwie do krów odpornych na mastitis, u których proporcja wymienionych leukocytów jest odwrotna. Limfocyty TCD8+, dzięki wydzielanej przez nie interleukinie (IL-10), mogą mieć działanie hamujące na inne komórki immunologiczne. Dlatego też podwyższenie ich odsetka, a obniżenie się ilości limfocytów TCD4+, mających właściwości wspomagające, może świadczyć o osłabieniu odporności i podatności na zakażenia. Nie wiadomo czy zależności te można przenieść bezpośrednio na macicę, ponieważ autorom nie udało się odnaleźć opublikowanych badań odnoszących się do fenotypowania leukocytów w macicy u krów. Wydaje się jednak, że rola oraz funkcje poszczególnych subpopulacji leukocytów, w macicy nie powinna różnić się w znaczący sposób od krwi, a tym bardziej od wymienia. Ponadto procesy immunoregulatorowe, w macicy u krów są słabo poznane, nic nie wiadomo o komórkach regulatorowych (Treg) i roli, jaką mogą pełnić w odporności lub podatności macicy na zakażenie. Chociaż rola tych limfocytów jest mało poznana u krów, to generalnie uważa się, że są to komórki odgrywające znaczącą rolę w powstawaniu i utrzymywaniu tolerancji immunologicznej. Niedobór tych limfocytów sprzyja powstawaniu zjawisk autoimmunologicznych, a nadmiar zwiększa tolerancję immunologiczną, co może sprzyjać hamowaniu odporności przeciwzakaźnej (45). Limfocyty regulatorowe nie stanowią jednej subpopulacji komórek, a mogą się do nich zaliczać między innymi limfocyty o fenotypie CD4+ (CD4+CD25+Foxp3+), CD8+ (CD8+CD25+Foxp3+, CD8+Foxp3+, CD8+CD122+, CD8+CD28-),  $\gamma\delta$ , NK i inne (61). U bydła komórki regulatorowe są bardzo słabo poznane jednak liczba ich, u dorosłego bydła stanowi 10-15%, a u cieląt nawet 40% wszystkich komórek jednojądrzastych krwi (68). Wysoka liczba tych komórek u bydła (68), dużo wyższa niż u ludzi czy myszy (36), może świadczyć o wysokiej istotności regulatorowej tej grupy komórek u krów, nie tylko w krwi obwodowej, ale również w narządach. Pomimo, że badania nad funkcjonowaniem komórek regulatorowych u bydła prowadzone są od wielu lat, to w dalszym ciągu ich funkcje poznane są jedynie

przy niektórych chorobach np. w paratuberkulozie (12) lub w pojedynczych narządach np. w wymieniu (65, 66). Brak jest natomiast danych literaturowych odnoszących się do komórek regulatorowych w macicy krów.

Ze względu na to, że *endometritis* jest główną przyczyną zaburzeń płodności u krów, podstawowym celem postępowania leczniczego w tym przypadku jest przywrócenie płodności krów w stadzie (81). W przypadku *endometritis* terapia oparta jest na stosowaniu prostaglandyny PGF<sub>2α</sub> lub jej analogów oraz domacicznych preparatów przeciwbakteryjnych. Ze względu na możliwość samowyleczenia *endometritis*, niektórzy autorzy zastanawiają się czy jakkolwiek terapia jest potrzebna (28). Według wielu autorów stosowanie prostaglandyny PGF<sub>2α</sub> u krów w okresie poporodowym poprawia późniejszą ich płodność (20, 63). Kasimanickam i wsp. (40) wykazał, że leczenie *endometritis* poprzez podawanie kloprostenolu pomiędzy 20 a 33 dniem po porodzie dawało o 70% lepsze wyniki zacieleń niż u krów nieleczonych. Natomiast LeBlanc (46) uważa, że podawanie prostaglandyn u krów z *endometritis* w okresie 20 – 26 dnia po porodzie, bez potwierdzenia obecności ciała żółtego na jajniku opóźnia zachodzenie w ciążę. Jednak ta sama terapia stosowana u krów pomiędzy 27 a 33 dniem po porodzie, powodowała skrócenie okresu między ciążowego o 18%, niezależnie od obecności ciała żółtego. Według nowych badań przeprowadzonych przez Dubuc i wsp. (16), stosowanie prostaglandyn PGF<sub>2α</sub> w leczeniu *endometritis* zarówno w 5 jak i 7 tygodniu po porodzie nie przynosi poprawy płodności krów.

Głównym celem wewnątrzmacicznej infuzji antybiotyków jest osiągnięcie wysokiego stężenia leczniczego antybiotyku w świetle macicy. Najczęściej używane preparaty stosowane domacicznie zawierają tetracyklinę, gentamycynę, penicylinę czy cefapirynę (44). Przy stosowaniu antybiotyków w leczeniu zapaleń macicy powinno się również zwracać uwagę na ich negatywne oddziaływanie. Mogą one osłabiać aktywność komórek fagocytujących w macicy, co ma szczególne znaczenie przy stanach o małym nasileniu - *endometritis subclinica*, ponieważ jeszcze bardziej zaburzają osłabione już mechanizmy odporności miejscowej i pomimo likwidacji patogenów całkowita eliminacja stanu zapalnego przedłuża się (21). Powstawanie lekooporności drobnoustrojów przy częstym stosowaniu antybiotyków, nieoparte wcześniejszym badaniem bakteriologicznym i antybiotykowrażliwością oraz obecność pozostałości antybiotyków w mleku i jadalnych tkankach krów, stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia człowieka (70). W związku z wymienionymi negatywnymi efektami stosowania antybiotyków, a dodatkowo wysokimi kosztami samej antybiotykoterapii, a często małej ich skuteczności, należy zastanowić się w przypadkach *endometritis* u krów mlecznych nad zastosowaniem alternatywnych metod postępowania leczniczego a najlepiej profilaktycznego (14, 80). Metodą zastępującą stosowanie antybiotyków, może być modulacja mechanizmów immunologicznych ogólnoustrojowych lub lokalnych, które spełniają podstawową rolę w likwidacji stanu zapalnego macicy.

Mało jest prac badawczych zajmujących się tą tematyką, jednak badania przedstawione przez Singh i wsp. (73) wskazują, że domaciczne podawanie LPS *E. coli* u krów z *endometritis*, pobudzało miejscowe mechanizmy odporności macicy, czego efektem było całkowite wyleczenie i przywrócenie płodności krów w ciągu jednego cyklu rujowego. Przedstawione badania dają podstawę do sprawdzenia wpływu innych substancji o działaniu immunomodulującym na miejscowe mechanizmy układu odpornościowego macicy u krów mlecznych (37). Jednak celowe i skuteczne zastosowanie preparatów modulujących, wymaga lepszego poznania funkcji układu immunologicznego macicy, a zwłaszcza jego stanu podczas występowania stanów zapalnych. Informacje te mogłyby znacznie ułatwić decyzję o podjęciu właściwej terapii wspomagającej miejscowe mechanizmy odporności.

Dla podkreślenia znaczenia *endometritis subclinica* na płodność oraz mając na uwadze niewielką ilość informacji dotyczących mechanizmów odporności macicy u krów mlecznych, zarówno we wczesnym jak i późnym okresie poporodowym, podjęte zostały badania mające na celu:

- ustalenie wpływu podklinicznych stanów zapalnych macicy, na wybrane parametry oceny rozrodu w stadzie krów mlecznych.
- ustalenie subpopulacji leukocytów (wybranych fenotypów), w krwi obwodowej oraz w wypłuczynach z macicy, u krów z *endometritis subclinica* oraz u krów bez *endometritis* będących w tym samym czasie po porodzie
- określenie aktywności fagocytarnej neutrofilii i makrofagów w wypłuczynach z macicy oraz w krwi obwodowej u krów z podklinicznymi stanami zapalnymi macicy i u krów bez *endometritis* będących w tym samym okresie poporodowym.
- ocenę wybranych cytokin ( TNF $\alpha$ , IL- 6, IL-10) oraz białek ostrej fazy – BOF (haptoglobina i SAA) w krwi obwodowej i wypłuczynach z macicy u krów z podklinicznymi stanami zapalnymi macicy, w aspekcie wykorzystania ich w profilaktyce i terapii *endometritis* w stadach krów mlecznych.

Wyniki dotyczące wymienionej problematyki opublikowane zostały w 5 publikacjach, jako tzw. osiągnięcie naukowe pt. **„Badania nad zastosowaniem wybranych parametrów oceny układu immunologicznego w diagnostyce podklinicznych stanów zapalnych macicy, w aspekcie wykorzystania ich w profilaktyce i terapii *endometritis* u krów mlecznych”**

Celem pierwszej publikacji 4.1.1., (Brodzki i wsp.: „Cytological evaluation of inflammation of the uterus and influence of endometritis on selected reproductive parameters in dairy cows. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 58, 235-242, 2014”, była ocena stanu układu rozrodczego krów, w okresie poporodowym i po jego zakończeniu oraz ustalenie, czy poporodowe stany zapalne macicy mają wpływ na późniejszy stan funkcjonalny endometrium. Celem badań było również ustalenie czy podkliniczne stany zapalne macicy wpływają na wybrane parametry rozrodu oceniane u badanych krów.

Badania wykonano na 60 krowach, rasy holsztyńsko – fryzyjskiej (HF). Zwierzęta zostały wybrane spośród 140 krów poddanych rutynowej kontroli lekarskiej w okresie poporodowym. Kontrola obejmowała poza badaniem ogólnego stanu zdrowia zwierząt, szczegółowe badanie układu rozrodczego, w oparciu o badanie rektalne macicy i jajników z wykorzystaniem USG, a także badanie bakteriologiczne oraz cytologiczne macicy, w celu monitorowania stanu *endometrium*. Za pomocą aparatu USG, była również określana średnica rogów macicy u badanych krów, w celu sprawdzenia dynamiki involucji macicy. Powyższe badania pierwszy raz zostały przeprowadzone w 5 dniu po porodzie, na ich podstawie ustalono, że u większości krów w tym czasie, występowało *metritis clinica*, objawiające się wypływem z dróg rodnych mniejszej bądź większej ilości, brunatnej lub brunatno - krwistej wydzieliny, często o charakterystycznym przykrym zapachu, macica była powiększona. Na tym etapie nie możliwe było ustalenie grup doświadczalnych. W drugim badaniu wykonanym w 26 dniu po porodzie, na podstawie badania cytologicznego macicy, zostało wybranych 30 krów z *endometritis subclinica* – zwierzęta te stanowiły grupę doświadczalną oraz 30 krów bez *endometritis*, które stanowiły grupę kontrolną. U wytypowanych do doświadczenia krów, wymienione badania przeprowadzono jeszcze dwukrotnie, w 40 oraz 61 dniu po porodzie, zgodnie z przyjętymi przez innych autorów zasadami, pierwsze badanie w 21-33 dniu po porodzie, drugie badanie pomiędzy 34 a 47 dniem po porodzie oraz trzecie badanie po 60 dniu od porodu (38, 39, 79). Cytologia macicy została wykonana za pomocą dwóch metod: szczoteczki cytologicznej oraz z wypłuczyn. Ocena preparatów opierała się na ustaleniu ilości neutrofilii w wykonanych rozmazach (39). Posiewy bakteriologiczne wykonano bezpośrednio ze szczoteczek na standardowe podłoża, przeznaczone do hodowli bakterii tlenowych, beztlenowych oraz grzybów. Po upływie 6 miesięcy od porodu w obu badanych grupach krów zostały porównane ze sobą najważniejsze dwa wskaźniki rozrodu brane pod uwagę w tym okresie przy ocenie rozrodu w stadzie. Okres międzyciążowy - OmC (odstęp czasu pomiędzy wycieleniem a kolejnym zacieleniem) i indeks zacielen - IZ zwany indeksem inseminacyjnym (ilość zabiegów inseminacyjnych potrzebnych do zajścia w ciążę).

Z przeprowadzonych przez autorów badań wynika, że u części krów w stadzie, u których nie leczono, występującego po porodzie *metritis*, dochodzi do powstania *endometritis subclinica* (21,3%). Stan taki może utrzymywać się bardzo długo po porodzie, będąc przyczyną obniżonej płodności krów. Wielu innych autorów potwierdza, że poporodowe zapalenia macicy przechodzą w postać podkliniczną i utrzymują się, nawet kilka miesięcy po porodzie (3, 23, 38, 48). Podkliniczne stany zapalne jak sama nazwa wskazuje, nie dają objawów zewnętrznych, z czym wiąże się niska wykrywalność tego schorzenia przez właścicieli, a nawet przez lekarzy prowadzących opiekę nad stadem. Standardowe badanie kliniczne układu rozrodczego, nawet z użyciem USG, nie pozwala skutecznie zdiagnozować podklinicznego stanu zapalnego macicy. Utrzymujące się najczęściej przy *endometritis* ciało żółte na

jajniku, wydzielając progesteron, powoduje osłabienie, zwłaszcza miejscowej odporności macicy, podtrzymując jej stan zapalny. Macica w stanie zapalnym nie wytwarza w odpowiedniej ilości PGF<sub>2α</sub>, która ma właściwości luteolityczne, ale produkuje PGE<sub>2</sub> mającej właściwości luteotropowe w konsekwencji podtrzymuje funkcję wydzielniczą ciała żółtego i niekorzystny w tym okresie wpływ progesteronu na funkcje endometrium (31, 56, 81). Zachodzące zmiany hormonalne i lokalna immunosupresja sprzyja namnażaniu się drobnoustrojów, głównie bakterii tlenowych, we wczesnym okresie poporodowym (*metritis*) oraz warunkowo beztlenowych i beztlenowych w okresie późniejszym (*endometritis*), co zostało również przedstawione w omawianych badaniach własnych. Badania nasze potwierdzają dominujące znaczenie bakterii tlenowych (głównie *E. coli*) we wczesnym okresie poporodowym a *T. pyogenes*, *F. necroforum* i *B. melaninogenicus* w okresie późniejszym. Badania innych autorów potwierdzają wyniki badań własnych (9, 18, 23, 88).

Przedstawione w badaniach, cytologicznie rozpoznane stany zapalne macicy, były przyczyną dużo gorszych parametrów rozrodu w grupie doświadczalnej krów OmC- 140,96 dni; IZ – 3,93), niż w grupie kontrolnej (90,96 dni; IZ – 1,86). Pogorszenie tych wskaźników wynikało przede wszystkim z zaburzeń cyklu rujowego. Głównie osłabionych objawów rujowych - co utrudniało wykrywanie rui, opóźnienia owulacji lub jej braku, przez co zabiegi inseminacji były skazane na niepowodzenie, a także wystąpienie cyst jajnikowych, powstałych z nieowulujących pęcherzyków jajnikowych, które najczęściej blokowały cykl rujowy po inseminacji, utrzymując właściciela w przekonaniu o ciąży zwierzęcia. Badania innych autorów, potwierdzając badania własne, podają ponadto prawdopodobny mechanizm obserwowanych zaburzeń. Autorzy ci wskazują, że *endometritis* może spowalniać wzrost pęcherzyków jajnikowych, zmniejszać maksymalną wielkość pęcherzyków przed owulacyjnymi, co zmniejsza stężenie estrogenów. Może też obniżyć masę ciałek żółtych i zmniejszać poziom progesteronu. Te zaburzenia w wytwarzaniu hormonów, poprzez osłabione oddziaływanie na wyższe piętra regulacji hormonalnej (podwzgórze i przysadka) niewystarczająco pobudzają je i powodują konkretne nieprawidłowości cyklu rujowego jak brak lub osłabione objawy rujowe, opóźniona lub brak owulacji czy wspomniane już cysty jajnikowe (48, 77). Wpływ innych czynników jak wydajność krów, ich sposób żywienia czy utrzymania został wyeliminowany, ponieważ zwierzęta zarówno grupy doświadczalnej jak i kontrolnej pochodziły z tego samego stada, dobór zwierząt był celowy, aby ograniczyć inne czynniki mogące wpływać na płodność (10, 49, 86).

Porównując cytologię wykonaną dwiema różnymi metodami pozyskania materiału, należy ocenić, że obie metody nadają się do oceny zaawansowania stanu zapalnego macicy. Pomiedzy metodami, pomimo widocznych różnic w liczbie leukocytów, nie ustalono różnic istotnych statystycznie. Jak wynika z przedstawionych badań, na podstawie cytologii możliwa jest zarówno poporodowa kontrola stanu *endometrium* macicy jak i ustalenie podklinicznych stanów zapalnych u krów,

utrzymujących się długo po porodzie, u których nie monitorowano okresu poporodowego. Oceniając wartość samych preparatów cytologicznych, wykonywanych ze szczoteczek oraz z wypłuczyn, należy podkreślić, że bardziej wartościowa jest cytologia wykonana ze szczoteczek niż z wypłuczyn, ponieważ materiał, zawiera o wiele więcej komórek nabłonka, co pozwala lepiej ocenić aktualny stan *endometrium* macicy. Na podstawie preparatów cytologicznych, autorom również udało się zaobserwować proces odtwarzania się nabłonka endometrialnego w okresie zdrowienia, co następuje w różnym czasie po porodzie. W obrazie cytologicznym z tego okresu, pomimo utrzymywania się stanu zapalnego pojawia się dużo większa ilość komórek młodych z okrągłymi jądrami komórkowymi i wyraźną cytoplazmą. Autorom nie udało się odnaleźć w dostępnej literaturze prac, związanych z powyższymi obserwacjami. Cytologia z wypłuczyn zawiera mniej komórek, co związane jest z pobraniem materiału powierzchniowego, pochodzącego tylko z jamy macicy, a nie ze ściany jak w pierwszej metodzie. Poza tym wypłuczyny zbierają materiał z większej powierzchni macicy, czego efektem jest zawsze wyższa ilość leukocytów oraz więcej artefaktów utrudniających ocenę preparatów. Przeprowadzone przez autorów badania stwierdzają jednoznacznie, że stan zapalny macicy z okresu poporodowego, może utrzymywać się bardzo długo po porodzie, jako podkliniczne *endometritis*, będąc jednocześnie przyczyną znacznego pogorszenia parametrów rozrodu u krów. W związku z przeprowadzonymi badaniami autorzy proponują, aby ocena cytologiczna macicy, najlepiej przy użyciu szczoteczki, wykonywana była jak najwcześniej po porodzie, nawet przed 21 dniem, do kiedy może utrzymywać się jeszcze poporodowe *metritis*.

Celem drugiej pracy 4.1.2., (Brodzki i wsp.: „Phenotyping of leukocytes and granulocyte and monocyte phagocytic activity in the peripheral blood and uterus of cows with endometritis. Theriogenology 2014, 82, 403-410”, była porównawcza ocena wybranych wskaźników immunologicznych w krwi obwodowej oraz w wypłuczynach z macicy krów z prawidłowym przebiegiem okresu *puerperium* oraz u krów z *endometritis subclinica*, w aspekcie ich przydatności w monitorowaniu okresu poporodowego.

Badania obejmowały zarówno wczesny jak i późny okres poporodowy. Przeprowadzono je w stadzie liczącym 140 krów rasy holsztyńsko – fryzyjskiej (HF) w wieku od 4 do 6 lat. Na podstawie badania cytologicznego wybrano 20 krów z *endometritis subclinica*, oraz 20 krów zdrowych będących w tym samym okresie po porodzie. Najistotniejszą częścią omawianej pracy były badania immunologiczne, które obejmowały fenotypowanie leukocytów oraz ocenę aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów. Fenotypy określono w oparciu o cytometryczną analizę cząsteczek powierzchniowych CD4, CD8, CD21, CD25 i CD14 oraz dodatkowo odsetek subpopulacji limfocytów o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Cząsteczki te oznaczono na leukocytach krwi obwodowej oraz w wypłuczynach z macicy w 5, 22 i 40 dniu po porodzie. Aktywność fagocytarną granulocytów i monocytów określono w tych samych

terminach badań, co fenotypowanie leukocytów przy użyciu komercyjnego zestawu Phagotest (Orpegon Pharma, Heidelberg, F.R.G), zaadaptowanego do metody cytometrii przepływowej.

W badaniach własnych, wykazano istotnie niższe średnie wartości odsetka subpopulacji leukocytów o fenotypie CD4, CD25 i CD14 oraz CD4/CD25 w krwi obwodowej u krów z *endometritis* w porównaniu do krów zdrowych. Podobne wyniki odnośnie kształtowania się wymienionych subpopulacji leukocytów w obu badanych grupach uzyskano również w wypłuczynach z macicy z tym, że u krów z zapaleniem macicy dodatkowo stwierdzono istotny spadek odsetka limfocytów CD21 oraz wzrost CD8. Może to wskazywać na immunosupresję, która współistniała z *endometritis*. Dane te wskazują także, że nie istnieje jeden mechanizm, który wyjaśniłby wszystkie aspekty zjawisk immunologicznych towarzyszących poporodowym stanom zapalnym macicy u krów. Istotny spadek odsetka limfocytów CD4, CD25, CD14 i CD4/CD25 w krwi obwodowej i dodatkowo CD21 w wypłuczynach z macicy, przy jednoczesnym wzroście odsetka limfocytów CD8 u krów z *endometritis*, może być związany z obecnością czynników hamujących uwalnianych podczas immunologicznej odpowiedzi zapalnej, wzrostem odsetka limfocytów supresorowych CD8 oraz współistniejącą infekcją bakteryjną. Istotny wzrost odsetka limfocytów TCD8 supresorowych w wypłuczynach macicy u krów z *endometritis* prawdopodobnie zapobiegał uszkodzeniu *endometrium* w wyniku utrzymującego się stanu zapalnego macicy z uwagi na ich immunoregulacyjne właściwości w stosunku do komórek efektorowych immunologicznej odpowiedzi zapalnej.

Innym mechanizmem sprzyjającym rozwojowi *endometritis* może być hamowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu poprzez spadek odsetka limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD4+CD25+ (Treg - T regulatory cells). Limfocyty regulatorowe Treg nie były dotychczas opisywane u krów z *endometritis* i dlatego trudno jest skonfrontować uzyskane w tym zakresie wyniki badań własnych. Wykazano, iż zarówno w krwi obwodowej jak i wypłuczynach z macicy w czasie występowania *endometritis* u krów, następował istotny spadek subpopulacji limfocytów Treg oraz leukocytów CD14. Limfocyty Treg oraz makrofagi pełniąc funkcję immunoregulacyjną i efektorową, w zasadniczy sposób wpływają na charakter i nasilenie odpowiedzi immunologicznej (32, 33, 71, 72). Stąd też zaburzenia czynności tych leukocytów spowodowane istotnym spadkiem ich odsetka w grupie krów z *endometritis*, mogło spowodować zaburzenie efektorowej fazy odpowiedzi immunologicznej i mogło też mieć istotny wpływ na wystąpienie i utrzymywanie się odczynów zapalnych w macicy krów.

Analizując wskaźniki aktywności fagocytarnej u krów obu badanych grup można stwierdzić, że ich kinetyka była związana z poszczególnymi terminami badań w okresie poporodowym. Istotny spadek aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów w wypłuczynach z macicy krów z *endometritis*, nastąpił już 5 dnia po wycieleniu i utrzymywał się przez cały okres obserwacji. Dotyczyło to szczególnie odsetka komórek fagocytujących, a w ostatnim okresie badań także średniej intensywności fluorescencji

będącego wykładnikiem nasilenia procesu fagocytozy granulocytów i monocytów. Obserwowany spadek wskaźników aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów wydaje się pozostawać w związku z utrzymującym się stanem zapalnym macicy i supresyjnym jego oddziaływaniem na komórkowe mechanizmy odporności nieswoistej. Indukcja supresji odporności nieswoistej polega na blokowaniu powierzchniowych receptorów, hamowaniu wewnątrzkomórko-wego metabolizmu, chemotaksji i przylegania komórek fagocytujących oraz zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych i wzrostu poziomu niektórych białek ostrej fazy (1, 13, 14, 42).

Sprawny układ komórek fagocytarnych stanowi jeden z podstawowych mechanizmów odporności przeciwzakaźnej macicy (7, 22, 23, 29, 81). W przypadku *endometritis* dominującą populacją komórek żernych są neutrofile przenikające z krwi obwodowej do ogniska zapalnego, które stanowią mechanizm szybkiego reagowania. Prawdopodobnie skutkiem zaburzonej funkcji biologicznej granulocytów i monocytów u krów z *endometritis*, był brak pełnej zdolności do bezpośredniej likwidacji infekcji bakteryjnej w pierwszej fazie okresu poporodowego oraz utrzymującego się odczynu zapalnego, co miało istotny wpływ na rozwój *endometritis* (42, 54, 89). Pozwala to jednocześnie sądzić, że dysfunkcja komórkowych mechanizmów miejscowej odporności macicy u krów, może być jedną z ważnych przyczyn niskiej skuteczności leczenia *endometritis*. Stąd też znajomość układu immunologicznego oraz jego zdolności przywracania zaburzonej homeostazy jest wskazaniem do uwzględnienia w profilaktyce i leczeniu *endometritis* u krów również preparatów o właściwościach immunomodulujących.

Kontynuacją omówionych powyżej badań, była trzecia publikacja 4.1.3., (Brodzki i wsp.: "Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum" *Theriogenology* 2015, 84, 11-18). Celem tych badań, była ocena stężenia pro- i przeciwzapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) oraz białek ostrej fazy (haptoglobiny - Hp i serum amyloid A - SAA) w surowicy krwi oraz w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis* we wczesnym okresie poporodowym oraz u krów zdrowych będących w tym samym czasie po porodzie. Badania wykonano na 40 krowach. 20 krów z *endometritis subclinica* oraz 20 krów bez *endometritis*. Badania u krów obu grup przeprowadzono w 5, 22 i 40 dniu po porodzie (DPP). Materiał do badań stanowiła surowica krwi oraz wypłuczyny z macicy. W badanym materiale metodą ELISA określono stężenie cytokin: tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukiny - 6 (IL-6), interleukiny -10 (IL-10) oraz białek ostrej fazy (BOF): haptoglobin (Hp) i serum amyloid A (SAA).

Przedstawione badania własne wykazały, że we wczesnym okresie po porodzie (5 dzień) poziom TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 w surowicy krwi nie różnił się pomiędzy krowami, u których w późniejszym czasie stwierdzono *endometritis* a krowami, u których *endometritis* nie występowało. Oznacza to, że stan zapalny macicy u części krów rozwinął się pomimo zbliżonych warunków wyjściowych. Brak wyraźnych



różnic w poziomach ocenianych cytokin pomiędzy badanymi grupami krów w pierwszym tygodniu po porodzie, wynika z faktu narażenia wszystkich zwierząt na podobne czynniki środowiskowe i zasiedlenie macicy wieloma rodzajami bakterii tuż po porodzie (79, 81). Świadczą o tym również wysokie wartości badanych parametrów w pierwszym tygodniu po porodzie w obu badanych grupach zwierząt. Jednak w późniejszych terminach badań poziom cytokin TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10, był istotnie wyższy u krów z *endometritis* niż u krów zdrowych. Może to wskazywać na większą aktywność pobudzonych komórek immunokompetentnych przede wszystkim w macicy, ale również w krwi obwodowej. Efektem było zwiększenie stężenia mediatorów stanu zapalnego w surowicy krwi krów z *endometritis*. Krowy zdrowe w okresie od 5 do 22 DPP eliminują z macicy większość drobnoustrojów, a przy braku lub nieznacznej ilości patogenów, miejscowe mechanizmy odporności nie są aktywowane. W wypłuczynach z macicy już wczesny okres poporodowy wykazywał istotne zmiany, a mianowicie wyższy poziom IL-6 i IL-10 a niższy poziom TNF- $\alpha$  u krów z *endometritis*. Ponadto wykazano, że poziom wymienionych interleukin w wypłuczynach z macicy był istotnie wyższy a poziom TNF- $\alpha$  niższy, niż w surowicy krwi w obu badanych grupach krów. Poza tym wysoki poziom IL-6 i IL-10 w wypłuczynach z macicy krów z *endometritis* utrzymywał się przez cały okres badań do 40 dnia po porodzie łącznie. Przypuszczalnie jedną z przyczyn wysokiego stężenia IL-6 było wydzielanie jej przez komórki *endometrium* macicy, jako reakcja wynikająca z podrażnienia receptorów TLR przez charakterystyczne pathogen associated molecular patterns (PAMPs) drobnoustrojów (7, 81, 85). Reakcja ta jest bardzo ważnym elementem aktywującym miejscową odpowiedź immunologiczną macicy, prowadzącą do chemotaksji leukocytów oraz wzmożenie aktywności fagocytarnej, istniejących już w macicy neutrofilii i makrofagów. Uaktywnione w ten sposób lub podrażnione bezpośrednio przez PAMPs drobnoustrojów leukocyty (głównie fagocyty) przebywające stale w macicy oraz napływające z krwi, również wydzielają cytokiny, przyczyniając się do wzrostu ich stężenia w macicy (74). Wcześniejsze badania własne 4.1.2, oraz wielu innych autorów (38, 39) potwierdzają obecność patogenów a także związaną z tym wyższą liczbę leukocytów (głównie neutrofilii) w macicy u krów z *endometritis*. Znalazło to odbicie w przedstawianych wynikach badań własnych w postaci podwyższenia stężenia prozapalnej IL-6 w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis*. Trudne do wyjaśnienia są niższe wartości TNF- $\alpha$  w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis* niż w grupie kontrolnej. Jedną z możliwości jest hamowanie wydzielania tej cytokiny przez IL-10, której poziom w tym czasie był bardzo wysoki. Zależności takie obserwowane były przy niektórych jednostkach chorobowych u ludzi i myszy (2, 53). Kwestią dalszych badań pozostaje jednak czy podobny mechanizm mógł występować również w macicach badanych krów. Wzrost ilości przeciwzapalnej IL-10, wynika przypuszczalnie z wzrastającego w utrzymującym się stanie zapalnym macicy poziomu limfocytów T CD8+, które mogą mieć funkcje supresorowe, hamujące reakcje zapalne.

Wcześniejsze badania własne 4.1.2, potwierdziły procentowy wzrost ilości limfocytów CD8+ w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis*.

Białka ostrej fazy (BOF) odgrywają ważną rolę w różnych etapach reakcji zapalnej, dzięki czemu mogą być markerami różnych jednostek chorobowych u bydła (52, 83). Spośród wielu występujących u krów BOF rolę pozytywnych biomarkerów spełniają głównie haptoglobina (Hp) oraz serum amyloid A (SAA) (84). SAA pojawia się w 24-48 godzin po zakażeniu, jako białko stanowiące pierwszą linię reagowania, a jej wydzielanie uzależnione jest od IL-1 oraz/lub TNF- $\alpha$  (67, 84). Natomiast Hp, jest białkiem stanowiącym drugą linię reagowania, której wydzielanie reguluje IL-6, a jej wysoki poziom charakterystyczny jest dla długotrwałych i słabo nasilonych procesów zapalnych (67, 84). Badania własne wydają się potwierdzać powyższe zależności. Poziom SAA jedynie w 22 DPP był istotnie wyższy w surowicy krwi krów z *endometritis* od poziomu tego białka u krów zdrowych. Jednocześnie obserwowano wysoki poziom TNF- $\alpha$  oraz obniżony poziom IL-6. Poziom haptoglobiny (Hp), był istotnie wyższy przez cały okres badań zarówno w surowicy krwi jak i w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis*. Takie zachowanie się stężenia BOF mogą świadczyć o utrzymywaniu się przewlekłego stanu zapalnego macicy od wczesnego okresu poporodowego do 40 DPP, z dodatkowym nadkażeniem macicy w 22 DPP. Bardzo interesujące z klinicznego punktu widzenia jest utrzymywanie się wysokiego stężenia Hp w surowicy krwi oraz w wypłuczynach z macicy krów z *endometritis*. Białko to może być uważane za marker stanu zapalnego macicy u krów. Trudny do wyjaśnienia jest wzrost poziomu Hp w wypłuczynach z macicy, ponieważ nie zostało potwierdzone miejscowe wytwarzanie tego białka w komórkach endometrium. Jednak istotny wzrost jej wartości może sugerować miejscową produkcję Hp w przebiegu *endometritis*. Inną możliwością jest przenikanie tego białka do światła macicy z krwi, w której notowano znacznie wyższe jej poziomy niż w wypłuczynach z macicy.

Celem czwartej publikacji 4.1.4., (Brodzki i wsp.: "Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis". *Animal Reproduction Science* 148, 109-114), była porównawcza ocena wybranych wskaźników nieswoistej i swoistej odporności immunologicznej u krów z *endometritis subclinica* oraz u krów bez stanu zapalnego macicy, w późnym okresie poporodowym. Badania wykonano w 65 dniu po porodzie na 40 krowach, które w oparciu o wyniki badań cytologicznych i bakteriologicznych podzielono na grupę doświadczalną (*endometritis subclinica*) i kontrolną (bez *endometritis*) po 20 sztuk w każdej. Metodą cytometrii przepływowej dokonano analizy cząsteczek powierzchniowych CD4, CD8, CD14, CD21, CD25 i CD4CD25 na leukocytach oraz określono aktywność fagocytarną granulocytów i monocytów w krwi obwodowej i wypłuczynach z macicy.

W badaniach własnych, u krów z *endometritis* wykazano istotnie niższe średnie wartości odsetka subpopulacji leukocytów o fenotypie CD4+, CD14+ i CD4+/CD25+ w krwi obwodowej i wypłuczynach z

macy. Dodatkowo, odsetek limfocytów CD21+ był znacznie niższy w wypłuczynach z macicy. Spadek odsetka limfocytów CD21+, jednego z głównych markerów limfocytów B, może wskazywać, że humoralna odpowiedź immunologiczna w macicy jest mniej ważna niż odpowiedź komórkowa. Procent komórek CD8+ był znacząco wyższy w wypłuczynach z macicy, co może świadczyć o kluczowej roli limfocytów CD8 w odpowiedzi immunologicznej macicy podczas *endometritis subclinica*. Wymienione zmiany w odsetku leukocytów mogą być związane z zakażeniem bakteryjnym i obecnością substancji hamujących (IL-10), uwalnianych przez limfocyty supresorowe CD8+ (4, 66, 76). Badania przeprowadzone przez Park et al. (65) potwierdzają, że u krów podatnych na zapalenie wymienia poziom limfocytów CD8+ zwiększa się a liczba limfocytów CD4+ maleje, powodując osłabienie miejscowych mechanizmów immunologicznych. W przeciwieństwie do naszych badań, Düvel i wsp. (2014; 17) wykazał wzrost liczby wszystkich ocenianych komórek immunologicznych (między innymi CD4+, CD8+, CD4+CD25+, CD14+), jak i neutrofilii w krwi obwodowej u krów z *endometritis subclinica*, w porównaniu do krów bez *endometritis*. Przypuszczalnie fenotypowy skład leukocytów krwi obwodowej, które biorą udział w odpowiedzi immunologicznej zależy od czynnika etiologicznego, który jest przyczyną zapalenia i od stopnia zaawansowania procesu chorobowego. Subklinicznemu zapaleniu macicy towarzyszy upośledzenie fagocytozy oraz zaburzenie mechanizmów immunoregulacyjnych, wśród których prawdopodobnie ważną rolę odgrywają: CD4+CD25+Treg (regulatorowe komórki T). Limfocyty Treg nie zostały dotychczas opisane u krów ze stanami zapalnymi macicy. W związku z tym trudno jest porównywać wyniki naszych badań w tym zakresie. Zarówno w krwi obwodowej jak i wypłuczynach z macicy krów z *endometritis*, wykazano znaczący spadek subpopulacji limfocytów Treg oraz CD14+ (monocyty/makrofagi). Limfocyty Treg i monocyty/makrofagi działają jako komórki efektorowe i immunoregulacyjne, i mogą w istotny sposób wpływać na rodzaj i nasilenie odpowiedzi immunologicznej (32, 33, 71, 72). Znaczny spadek odsetka tych leukocytów w grupie krów z *endometritis*, mógł spowodować zaburzenia fazy efektorowej odpowiedzi immunologicznej, mógł również mieć istotny wpływ na powstawanie i utrzymywanie się subklinicznych reakcji zapalnych w macicy zwierząt doświadczalnych. Nasze badania wykazały również upośledzenie aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów/makrofagów u krów z *endometritis subclinica*, co może być związane z utrzymującym się subklinicznym stanem zapalnym macicy oraz jego hamującym wpływem na komórkowe mechanizmy nieswoistej odporności. Mechanizmy te, należą do podstawowych mechanizmów, przeciwwakażnej odporności macicy (1, 13, 14). Upośledzenie funkcji granulocytów i monocytów/makrofagów u krów z *endometritis* prawdopodobnie spowodowało zmniejszoną zdolności do bezpośredniego eliminowania infekcji bakteryjnej i mogło być przyczyną *endometritis subclinica* (42, 55, 89). Obecne badania sugerują, że dysfunkcja komórkowych mechanizmów lokalnej odporności macicy u krów z *endometritis subclinica*, może być przyczyną przewlekle utrzymującego się zapalenia

macy w stadach krów mlecznych i powinny być brane pod uwagę w trakcie terapii.

W ostatniej z cyku publikacji, zaliczanej do Osiągnięcia Naukowego 4.1.5., (Brodzki i wsp.: "Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period." Veterinary Research Communications 2015, 39, 143-149) celem, była porównawcza ocena stężenia cytokin prozapalnych (tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukine 6 (IL-6)), cytokin przeciwzapalnych (interleukine 10 (IL-10)), białek ostrej fazy (haptoglobin (Hp) oraz serum amyloid A (SAA)), w surowicy krwi oraz w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis subclinica* i u krów zdrowych, w późnym okresie poporodowym.

Badania zostały przeprowadzone na 40 krowach w 60 dniu po porodzie. Na podstawie wyników badania cytologicznego, zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy: krowy z *subclinical endometritis* oraz krowy zdrowe (po 20 krów w każdej). Materiał do badań stanowiła surowica krwi oraz wypłuczyny z macicy. W badanym materiale metodą ELISA oceniono stężenie cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 oraz białek ostrej fazy (BOF), Hp oraz SAA.

Są to pierwsze badania tego typu wykonane w wypłuczynach z macicy krów w późnym okresie poporodowym. Przedstawiony w badaniach własnych wyższy poziom cytokin TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 oraz białek ostrej fazy SAA i Hp w surowicy krwi krów grupy doświadczalnej, może być związany z występującą u nich subkliniczną postacią stanu zapalnego macicy. Większa aktywność komórek immunokompetentnych, pobudzonych głównie w macicy, ale również w krwi obwodowej, mogła być przyczyną wzrostu stężenia mediatorów stanu zapalnego w surowicy krwi. We wczesnym okresie poporodowym do 21 DPP większość drobnoustrojów jest eliminowana z macicy, a w okresie 6 – 8 tygodni po porodzie macica powinna być już jałowa (81). Przy niewielkiej ilości patogenów lub ich braku, miejscowe mechanizmy odporności nie są aktywowane lub są jedynie nieznacznie. Stężenie mediatorów stanu zapalnego (cytokiny, chemokiny, BOF), również nie ulega wówczas podwyższeniu, co obserwujemy u krów zdrowych. Natomiast u krów z *endometritis*, u których stan zapalny macicy utrzymuje się, widoczny jest wzrost wymienionych mediatorów. Badania przeprowadzone przez Kasimanickam et al. (41), zgodne są z badaniami własnymi i potwierdzają wyższe stężenie cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6) w surowicy krwi krów z *endometritis* w porównaniu do krów zdrowych. Natomiast badania przeprowadzone, przez Kim et al. (43) nie wykazały różnic w stężeniu wymienionych cytokin w surowicy krwi pomiędzy krowami z *endometritis* i krowami zdrowymi. Ishikawa et al. (35) również nie obserwowali istotnych zmian w ilości IL-6 w surowicy krwi u krów z *endometritis*.

W badaniach własnych w wypłuczynach z macicy, wykazano istotnie wyższy poziom IL-6, IL-10 oraz Hp u krów z *endometritis* w porównaniu do krów zdrowych. Ponadto wykazano również, że u krów ze stanem zapalnym stężenie IL-10 było dwukrotnie wyższe w wypłuczynach z macicy niż w surowicy krwi. Jedną z przyczyn wysokiego stężenia IL-6 było wydzielanie jej przez komórki *endometrium*

macy, oraz leukocyty przebywające stale w macicy i napływające do miejsca zapalenia w wyniku chemotaksji, jako reakcja na kontakt z patogenami (74). Wcześniejsze badania własne 4.1.2., 4.1.4., potwierdzają obecność patogenów a także związaną z tym wyższą liczbę leukocytów (głównie neutrofilii) w macicy u krów z *subclinical endometritis*. Znalazło to odbicie w przedstawianych wynikach badań własnych w postaci podwyższenia stężenia prozapalnej IL-6 w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis*. Wzrost stężenia przeciwzapalnej IL-10, może wynikać z wzrastającego w utrzymującym się stanie zapalnym macicy poziomu limfocytów T CD8+, które mogą mieć funkcje supresorowe, hamujące reakcje zapalne. Limfocyty CD8+ poprzez wydzielanie IL-10 pełnią funkcję ochronną dla tkanek *endometrium* dzięki hamującemu wpływowi na immunokompetentne komórki efektorowe, co osłabia reakcje autoimmunologiczne (4, 66, 76). Niestety z badań własnych wynika również, że takie oddziaływanie może wiązać się z osłabieniem miejscowej odporności przeciwwzakaźnej i brakiem całkowitej eliminacji drobnoustrojów z macicy. Efektem może być długotrwałe utrzymywanie się stanu zapalnego tego narządu w postaci *endometritis*.

W badaniach własnych, poziom SAA jedynie w surowicy krwi był istotnie wyższy u krów z *endometritis* od poziomu tego białka u krów zdrowych. Jednocześnie u krów z *subclinical endometritis* obserwowano wysoki poziom TNF- $\alpha$ . Poziom haptoglobiny (Hp), był istotnie wyższy zarówno w surowicy krwi, jak i w wypłuczynach z macicy u krów z *endometritis*. Takie zachowanie się stężenia BOF mogą sugerować utrzymywanie się przewlekłego stanu zapalnego macicy. SAA jest białkiem stanowiącym pierwszą linię reagowania, a jej wydzielanie uzależnione jest od IL-1 oraz/lub TNF- $\alpha$  (67, 84). Natomiast Hp jest białkiem stanowiącym drugą linię reagowania, której wydzielanie reguluje IL-6, a jej wysoki poziom charakterystyczny jest dla długotrwałych i słabo nasilonych procesów zapalnych (67, 84). Bardzo interesujące jest wysokie stężenie Hp zarówno w surowicy krwi, jak i w wypłuczynach z macicy krów z *endometritis*, w późnym okresie poporodowym. Białko to może być uważane za marker stanu zapalnego macicy u krów, nie tylko we wczesnym okresie poporodowym, jak wykazano w poprzedniej pracy (4.1.3.), ale również w okresie późniejszym.

Z przedstawionych badań własnych 4.1.3., 4.1.5. wynika, że ocena poziomu wybranych cytokin zarówno w surowicy krwi jak i w wypłuczynach z macicy, może stanowić czuły wskaźnik diagnostyczny *endometritis subclinica* u krów. Warunkiem prawidłowej oceny kierunku rozwoju stanu zapalnego oraz ściśle z nim związanych mechanizmów miejscowej odporności macicy, jest jednoczesne badanie stężenia cytokin o antagonistycznym oddziaływaniami. Dzięki temu możliwe jest dokładniejsze określenie aktualnego stanu odporności miejscowej macicy, co w znacznej mierze ułatwia ustalenie dalszego postępowania profilaktycznego lub leczniczego. Przy wzroście poziomu cytokin prozapalnych z równoczesnym wzrostem cytokin przeciwzapalnych, jak IL-10 może być wskazane stosowanie preparatów o działaniu immunostymulującym. Natomiast przy wzroście stężenia jedynie cytokin

prozapalnych jak IL-6 czy TNF- $\alpha$  nie ma potrzeby stosowania takich preparatów. Badania własne podobnie jak badania innych autorów (30) wykazały, że markerem *endometritis* u krów może być również haptoglobina. Ocena jej stężenia w surowicy krwi, ale również w wypłuczynach z macicy może stanowić czuły wskaźnik rozwoju *endometritis*.

W oparciu o uzyskane wyniki badań z powyższego cyklu publikacji nasuwają się następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. W macicy krów z *endometritis subclinica* zarówno we wczesnym jak i późnym okresie poporodowym, dochodzi do wzrostu odsetka limfocytów CD8+, które poprzez działanie supresorowe, mogą osłabiać miejscowe mechanizmy odporności macicy.
2. Podczas występowania *endometritis subclinica*, dochodzi do obniżenia aktywności fagocytarnej granulocytów oraz monocytów wyizolowanych z macicy, co może przyczyniać się do osłabionej eliminacji patogenów i utrzymywania się subklinicznych stanów zapalnych macicy.
3. W surowicy krwi krów z *endometritis subclinica* występuje wzrost stężenia TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 oraz białek ostrej fazy SAA i Hp w porównaniu z krowami zdrowymi, co może być związane z występującą u nich subkliniczną postacią stanu zapalnego macicy.
4. W wypłuczynach z macicy pochodzących od krów z podklinicznymi stanami zapalnymi macicy, wykazano wzrost stężenia IL-6, IL-10 oraz Hp. Są to pierwsze badania tego typu wykonane w wypłuczynach z macicy krów w późnym okresie poporodowym.
5. Bardzo interesujące z klinicznego punktu widzenia jest utrzymywanie się wysokiego stężenia haptoglobiny w wypłuczynach z macicy krów z *endometritis subclinica*, pomimo braku danych świadczących o produkcji tego białka w komórkach endometrium. Z przedstawionych badań wynika jednak, że Hp może być wykorzystana, jako marker stanu zapalnego macicy u krów.
6. Ocena subpopulacji leukocytów, aktywności fagocytarnej fagocytów oraz wybranych cytokin i białek ostrej fazy ma duże znaczenie w diagnozowaniu *endometritis*. Ocena wymienionych parametrów ma również wartość prognostyczną, mówiącą o kierunku rozwoju *endometritis* oraz ułatwia podjęcie decyzji o zastosowaniu ewentualnej terapii wspomagającej miejscowe mechanizmy odporności macicy.
7. W badaniach własnych, wykazano znaczący spadek subpopulacji limfocytów Treg oraz CD14 (monocyty/makrofagi), zarówno w krwi obwodowej jak i wypłuczynach z macicy krów z *endometritis subclinica*. Limfocyty Treg i monocyty/makrofagi działają, jako komórki immunoregulacyjne i efektorowe, i mogą w istotny sposób wpływać na rodzaj i nasilenie odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty Treg nie zostały dotychczas opisane u krów z *endometritis subclinica*.

8. W przeprowadzonych badaniach cytologicznych zaobserwowano, iż bardziej wartościowa jest cytologia wykonana ze szczoteczek niż z wypłuczyn, ponieważ materiał pobrany przy wykorzystaniu szczoteczek, zawiera o wiele więcej komórek nabłonka, co pozwala lepiej ocenić aktualny stan *endometrium* macicy.
9. Na podstawie preparatów cytologicznych, autorom udało się również zaobserwować proces odtwarzania się nabłonka endometrialnego w okresie zdrowienia, co następuje w różnym czasie po porodzie. W obrazie cytologicznym z tego okresu, pomimo utrzymywania się stanu zapalnego pojawia się dużo większa ilość komórek młodych z okrągłymi jądrami komórkowymi i wyraźną cytoplazmą.

#### Piśmiennictwo

1. Aderem A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003, 187, 340-345.
2. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 2009, 101, 36-47.
3. Ahmadi MR, Nazifi S, Ghaisari HR. Comparative cervical cytology and conception rate in postpartum dairy cows. *Veterinarski Arhiv* 2006, 76, 323-332.
4. Banos G, Wall E, Coffey MP, Bagnall A, Gillespie S, Russel GC, McNelly TN. Identification of immune traits correlated with dairy cow health, reproduction and productivity, *PLoS One*. 2013, 8, 657-66.
5. Barański W, Podhalecz-Dzięgielewska M, Zduńczyk S, Janowski T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*. 2012, 78, 1939-1947.
6. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008, 69, 714-723.
7. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevith RJ. How we detect microbes and respond to them: toll-like receptors and their transducers. *Journal of Leucocyte Biology* 2003, 74, 479-485.
8. Beutler BA.: TLRs and innate immunity. *Blood* 2009, 113, 1399–1407.
9. Bicalho RC, Machado VS, Bicalho ML, Gilbert RO, Teixeira AG, Caixeta LS, Pereira RV. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia Coli*. *Journal of Dairy Science* 2010, 93, 5818-5830.
10. Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Martinez N, Lima FS, Staples CR, Thather WW, Santos JEP. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction* 2012, 9, 260-272.

11. Chapwanya A. Uterine disease in dairy cows: classification, diagnosis and key roles for veterinarians. *Irish Veterinary Journal* 2008, 61,183-185.
12. Coussens PM, Sipkovsky S, Murphy B, Roussey J, Colvin ChJ. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comperative Immunology and Microbiology Infection Diseases* 2012, 35, 233-239.
13. Demeyere K, Remijnsen Q, Demon D, Breyne K, Notebaert S, Boyen F, Guérin CJ. *Escherichia coli* induces bovine neutrophil cell death independent from caspase-3/-7/-1, but with phosphatidylserine exposure prior to membrane rupture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2013, 153, 45-56.
14. Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science* 2001, 67, 135-152.
15. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2010, 93, 5225-5233.
16. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, Leblanc SJ. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2011, 94, 1339-1346.
17. Düvel A, Maaß J, Heppelmann M, Hussen J, Koy M, Piechotta M, Sandra O, Smith DG, Sheldon IM, Dieuzy-Labaye I, Zieger P, Schuberth HJ. Peripheral blood leukocytes of cows with subclinical endometritis show an altered cellular composition and gene expression. *Theriogenology* 2014, 81, 906-917.
18. Földi J, Kulcsár M, Pécsia A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science* 2006, 96, 265-281.
19. Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology* 2009, 71, 993-1004.
20. Galvão KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. Effect of prostaglandin F2 alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2009a, 92, 4906-4913.
21. Galvão KN, Greco LF, Vilela JM, Sa Filho MF, Santos JE. Effect of intrauterine infusion of Ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2009b, 92, 1532-1542.
22. Galvão KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard CL, Butler WR, Gilbert RO. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 2010, 93, 2926-2937.



23. Gautam G, Nako T, Koike K, Long ST, Yusuf M, Ranasinghe RM, Hayashi A. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology* 2010, 152, 411-416.
24. Gilbert RO, Shin Sang T, Guard CL, Hollis EN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005, 64, 1879-1888.
25. Gilbert RO, Santos LR, Galvão KN, Brittin SB, Roman H.B. The relationship between postpartum uterine bacterial infection and subclinical endometritis. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 469.
26. Gilbert RO. The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. *Reproduction Fertility Development* 2011, 24, 252-257.
27. Goff J.P.: Immune suppression around the time of calving and the impact of metabolic disease. *Hungarian Veterinary Journal* 2008, 130, 39-41.
28. Haimerl P, Hauwieser W, Arlt S. Therapy of bovine endometritis with prostaglandin F<sub>2α</sub>: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 2013, 96, 2973-2987.
29. Hansen PJ. The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 2011, 46, 18-30.
30. Heidarpour H, Mohri M, Fallah-Rad AH, Dehghan Shahreza F, Mohammadi M. Acute-phase protein concentration and metabolic status affect the outcome of treatment in cows with clinical and subclinical endometritis. *Veterinary Record* 2012, 171, 219-223.
31. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2α</sub> to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology* 2009, 150, 1912-1920.
32. Hoek A, Rutten VPMG, Kool J, Arkesteijn GJA, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets A. Subpopulations of bovine WC1<sup>+</sup>γδ T cells rather than CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Foxp3 T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Veterinary Research* 2009, 40, 06.
33. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-β-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in Immunology* 2008, 29, 429-435.
34. Huszenicza G, Fodor M, Gacs M, Kulscar MJ, Dohmen M, Vamos L, Portokolab T, Kegl J, Bartyik JC, Janosi Szita G. Uterine bacteriology, resumption of ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals* 1999, 34, 237-45.
35. Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *Journal of Veterinary Medical Science* 2004, 66, 1403-1408.
36. Itohara S, Nakanishi N, Kanagawa O, Kubo R, Tonegawa S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta: analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny

- and in peripheral lymphoid organs. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1989, 86, 5094-5098.
37. Kaczmarowski M, Malinowski E, Markiewicz H. Influence of various treatment methods on bacteriological findings in cows with puerperal metritis. Polish Journal of Veterinary Science 2004, 7, 171-174.
  38. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology 2004, 62, 9-23.
  39. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. Canadian Veterinary Journal 2005, 46, 255-259.
  40. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. Theriogenology 2005, 63, 818-830.
  41. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. Reproduction Biology Endocrinology 2013, 11, 103.
  42. Kim IH, Na KJ, Yang MP. Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. Journal of Reproduction and Development 2005, 51, 757-764.
  43. Kim IH, Kang HG, Jeong JK, Hur TY, Jung YH. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. Theriogenology 2014, 82, 427-432.
  44. Knutti B, Kupfer U, Busato A. Reproductive efficiency of cows with endometritis after treatment with intrauterine infusions or prostaglandin injections, or no treatment. Journal Veterinary Medicine Association 2000, 47, 609-615.
  45. Kopeć-Szlęzak J. Subpopulacje limfocytów T. Onkologia Polska 2005, 8, 17-20.
  46. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. Journal of Dairy Science 2002, 85, 2237-2249.
  47. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. Journal of Dairy Science 2002, 85, 2223-2236.
  48. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. Veterinary Journal 2008, 176, 102-114.

49. LeBlanc SJ. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2012, 47, 18-30.
50. Lee JI, Kim IH. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *Journal of Veterinary Science* 2007, 8, 283-288.
51. López-Gatius F, Labernia J, Santolaria P, López-Bejar M, Rutllant J. Effect of reproductive disorders previous to conception on pregnancy attrition in dairy cows. *Theriogenology* 1996, 46, 643-648.
52. Maden M, Ozturk AS, Bulbul A, Avci A, Yazar E. Acute-phase proteins, oxidative stress, and enzyme activities of blood serum and peritoneal fluid in cattle with abomasal displacement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012, 26, 1470-5.
53. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman L. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994, 343, 707-8.
54. Mateus L, Lopes da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 2002, 37, 31-35.
55. Mateus L, Lopes da Costa L, Carvalho H, Serra P, Robalo Silva J. Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reproduction in Domestic Animals* 2002, 37, 176-180.
56. Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P, Zięcik AJ. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Animal Reproduction Science* 2003, 15, 143-54.
57. McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche J, Burke C, Mitchell M, Meier S. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 2011, 76, 229-240.
58. Medzhitov R., Jeneway C.A.Jr.: Decoding the patterns of self and non-self by innate immune system. *Science* 2002, 926, 298-300.
59. Miller AN, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Rycroft AN, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* 2007, 68, 972-980.
60. Murakami S, Miyamoto Y, Skarżynski DJ, Okuda K. Effects of tumor necrosis factor-alpha on secretion of prostaglandins E2 and F2alpha in bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Theriogenology* 2001, 55, 1667-1678.
61. Niedźwiecka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Charakterystyka subpopulacji limfocytów T. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2013, 67, 371-379.

62. Olson JD, Ball L, Mortimer RG, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *American Journal of Veterinary Research* 1984, 45, 2251-2255.
63. Paisley LG, Mickelson WD, Anderson PB. Mechanism and therapy for retained fetal membranes and uterine infection of cows: A review. *Theriogenology* 1986, 25, 353- 381.
64. Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon-tau. *Endocrinology* 2002, 143, 2936-2943.
65. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. Suppression of proliferative response of BoCD4+ T lymphocytes by activated BoCD8+ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993, 36, 137-151.
66. Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies ChJ. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *Journal of Veterinary Science* 2004, 5, 29-39.
67. Petersem HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 2004, 35, 163-87.
68. Rogers AN, Van Buren DG, Hedblom E, Tilahun ME, Telfer JC, Baldwin CL.  $\gamma\delta$  T cell function varies with the expressed WC1 co-receptor. *Journal of Immunology* 2005, 174, 3386-3393.
69. Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. Uterine infections in the postpartum cow, II: possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology* 1981, 15, 573-580.
70. Sannmann I, Burfeind O, Voigtsberger R, Heuwieser W. Comparison of two monitoring and treatment strategies for cows with acute puerperal metritis. *Theriogenology* 2013, 79, 961-969.
71. Seo KS, Lee SU, Park YH, Davis WC, Fox LK, Bohach GA. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4+ and CD8+ T cells. *Infection Immunology* 2007, 75, 260-269.
72. Seo KS, Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Davis WC, Bohach GA. Development of monoclonal antibodies to detect bovine FOXP3 in PBMCs exposed to a staphylococcal superantigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009, 128, 30-36.
73. Singh J, Sidhu SS, Dahliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Animal Reproduction Science* 2000, 59, 159-166.
74. Singh J, Murray RD, Mshelia G, Woldehiwet Z. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Veterinary Journal* 2008, 175, 301-309.

75. Shafer-Weaver KA, Pighetti GM, Sordillo LM. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the post-partum period. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996, 212, 271-279.
76. Shafer-Weaver K.A., Sordillo L.M.: Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the post-partum period. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997, 56, 53-64.
77. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Veterinary Record* 2002, 123, 837-845.
78. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science* 2004, 82, 295-306.
79. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006, 65, 1516-1530.
80. Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary Journal* 2008, 176, 115-121.
81. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanism of infection and immunity in the female reproductive tract in Cattle. *Biology of Reproduction* 2009, 81, 1025.
82. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, 140, 805-820.
83. Tothova CS, Nagy O, Seidel H, Kovac G. Acute phase proteins in relation to various inflammatory diseases of calves. *Comperative Clinical Pathology* 2012, 21, 1037-42.
84. Tothova CS, Nagy O, Seidel H, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a reviw. *Veterinari Medicina* 2014, 59, 163-80.
85. Turner ML, Healer GD, Sheldon IM. Immunity and inflammation in the uterus. *Reproduction in Domestic Animals* 2012, 47, 402-409.
86. Wathes DC. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals* 2012, 47, 304-312.
87. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007, 68, 549-59.
88. Williams EJ, Herath S, England GC, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *Animal* 2008, 2, 1153-1157.

89. Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TA, Schubreth HJ. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in post-partum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 2000, 54, 771-786.

**Prace stanowią oryginalny element badań dotyczących zastosowania wybranych parametrów oceny układu immunologicznego w diagnostyce podklinicznych stanów zapalnych macicy, w aspekcie wykorzystania ich w profilaktyce i terapii *endometritis* u krów mlecznych.**

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w 1998 roku, zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Zakładzie Andrologii i Biotechnologii Rozrodu, Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt UP w Lublinie, pod kierownictwem prof. dr hab. Zygmunta Wrony.

Pierwszy okres mojej pracy związany był zarówno z pracą kliniczną, jak również naukowo-dydaktyczną. W tym czasie zapoznałem się z technikami diagnostycznymi oraz terapeutycznymi wykorzystywanymi w postępowaniu lekarskim szczególnie, ginekologiczno-położniczym u samic, ale również w postępowaniu andrologicznym u samców zwierząt domowych. Od początku mojej pracy uczestniczyłem aktywnie w działalności naukowo-dydaktycznej, co po pewnym czasie umożliwiło mi sprecyzowanie swojego profilu naukowo-badawczego. Początkowo dotyczył on problematyki związanej z oceną wybranych wskaźników immunologicznych u krów w poszczególnych fazach cyklu jajnikowego i różnych okresach ciąży, a także wpływu wybranych preparatów oraz pór roku na płodność samców zwierząt domowych. Ponadto moje zainteresowania dotyczyły również problematyki związanej z nowotworami gruczołu sutkowego u suk, szczególnie z niestandardową diagnostyką różnicową pomiędzy nowotworami złośliwymi i niezłośliwymi.

Efektom prowadzonych badań i obserwacji poczynionych w tym czasie są publikacje i doniesienia, które ukazały się przed uzyskaniem tytułu doktora nauk weterynaryjnych:

1. Wrona Z, Krakowski L, Kowalski C, Kostro K, **Brodzki P**, Łopuszyński W. Ocena płodności oraz wybranych wskaźników odporności komórkowej po zastosowaniu tamoxifenu u psów. *Medycyna Weterynaryjna* 2003, 59, 1000-1004.
2. Krakowski L, Kostro K, Wrona Z, Krakowska I, **Brodzki P**, Piech T, Kostrzewa A. Metabolizm tlenowy neutrofilów i monocytów krwi w okresie okołoporodowym u krów zdrowych i z zatrzymaniem łożyska. *Medycyna Weterynaryjna* 2004, 60, 1080-1083.
3. Krakowski L, Wrona Z, Kostro K, Krakowska I, Kostrzewa A, Piech T, **Brodzki P**. Ocena subpopulacji limfocytów TCD4+ i TCD8+ oraz aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów w krwi obwodowej krów i jałówek w okresie okołoporodowym. *Medycyna Weterynaryjna* 60, 415-419, 2004.
4. Brodzki A, Pasternak K, Balicki I, **Brodzki P**, Szponder T, Tataro MR. Wolne aminokwasy w nowotworach gruczołu sutkowego u psów. *Medycyna Weterynaryjna* 2004, 60, 937-941.
5. Brodzki A, Pasternak K, Sztanke M, **Brodzki P**, Szponder T. Magnesium Concentration in Mammary Tumours in Dogs. *Magnesium Research*. 2004, 17, 79-84.

Wyniki badań z tego obszaru były prezentowane również na konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie doniesień i posterów:

1. Wrona Z., Krakowski L., **Brodzki P.** Wpływ tamoksifenu na wybrane wskaźniki płodności i niektóre parametry odporności u psów. XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 21-23 IX 2000. Annales UMCS, s. DD, 55, 462, 2000.
2. Krakowski L., Wrona Z., Kostro K., **Brodzki P.** Characterization of subpopulation of T lymphocytes in blood of cows and heifers at the last trimester of gestation. Polish J. Vet. Sci. 2001, 4, 132. Abstracts of the 3<sup>rd</sup> Congress of Veterinary Immunologists 13-14.09.2001, Olsztyn, publ. Polish J. Vet. Sci. 2001, 4, 132.
3. Krakowski L., Wrona Z., Kostro K., **Brodzki P.** Charakterystyka subpopulacji limfocytów T CD4 i CD8 w krwi obwodowej u jałówek w przebiegu cyklu rujowego, ciąży i okresu poporodowego. Materiały z Konferencji naukowej pt. "Praktyczne implikacje genetycznych, immunologicznych i hormonalnych badań układu Rozrodczego i gruczołu mlekowego zwierząt" Wenecja, 19-20.X. 2001, s. 113-115.
4. Wrona Z., **Brodzki P.**, Krakowski L., Marcich R. Ocena przydatności rozplodowej knurków kwalifikowanych do stacji unasienniania loch lub krycia naturalnego. Materiały z Międzynarodowej Sesji Naukowej pt. "Zaburzenia w rozrodzie zwierząt wysokoprodukcyjnych". Polanica Zdrój, 13-14 czerwca 2003, str. 39.

W celu pogłębienia wiedzy dotyczącej problematyki rozrodu zwierząt podjąłem w 2000 roku Studia Podyplomowe z zakresu Rozrodu Zwierząt, które zakończyłem pozytywnie zdany egzaminem w 2002 roku. Od początku mojej działalności w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt, nawiązałem i utrzymywałem kontakty z wieloma Katedrami z macierzystej uczelni jak również z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie oraz Poznaniu. Dzięki temu możliwe było wykorzystanie nowoczesnej aparatury badawczej (np. cytometria przepływowa), niedostępnej wówczas na rodzimej Uczelni.

Nabywane coraz większe doświadczenie lekarsko-weterynaryjne połączone z możliwością konsultacji z innymi ośrodkami naukowymi, przyczyniło się w tym okresie do ostatecznego sprecyzowania, moich zainteresowań naukowych w zakresie rozrodu psów samców. Do szczególnie istotnych badań zaliczyć należy ocenę wpływu leków stosowanych w terapii nowotworów na *libido sexualis* i wybrane wskaźniki jakości nasienia oraz określenie wpływu wymienionych preparatów, na kształtowanie się wybranych parametrów odporności komórkowej u leczonych psów. Uzyskane wyniki badań własnych z tego zakresu zostały przedstawione w formie dysertacji doktorskiej.



Zakończeniem tego etapu mojej działalności naukowej było uzyskanie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR (obecnie UP) w Lublinie w 2004 roku, stopnia doktora nauk weterynaryjnych na podstawie pracy: „Wpływ wybranych leków stosowanych w terapii nowotworów na behavior seksualny, wartość biologiczną nasienia oraz niektóre parametry odporności u psów.” Promotorem mojej pracy doktorskiej był Pan prof. dr hab. Zygmunt Wrona.

## **5.2. Dorobek naukowy po uzyskaniu tytułu doktora nauk weterynaryjnych**

Wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w 3 publikacjach naukowych w czasopiśmie z listy A MNiSZW. Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowany w badaniach własnych tamoksifen, w ogólnie przyjętych dla psów dawkach terapeutycznych, wywierał negatywny wpływ na funkcję układu rozrodczego psów samców powodując, początkowo już w pierwszym tygodniu jego stosowania, pogorszenie się, jakości większości ocenianych parametrów nasienia, a w późniejszym czasie, od drugiego tygodnia jego stosowania, aspermię świadcząca o całkowitej utracie płodności samca. Utrata płodności okazała się okresowa i trwała około 60 dni. Po tym czasie samce odzyskiwały zdolność produkcji ejakulatu jednak o bardzo osłabionej jakości, która w późniejszym czasie ulegała sukcesywnej poprawie.

Zastosowany w badaniach własnych cyklofosfamid, również prowadził do obniżenia wskaźników, jakości nasienia, zarówno podczas jak i po zakończeniu jego podawania. Objawiało się to, nieznacznym obniżeniem objętości nasienia, obniżeniem odsetka plemników wykazujących prawidłowy ruch indywidualny, podwyższeniem ilości plemników martwych oraz z uszkodzoną błoną komórkową, a także znacznym obniżeniem koncentracji plemników w ejakulacie. W badaniach własnych obserwowano jedynie pogorszenie się, jakości ejakulatu a obecność plemników świadczyła o ciągle aktywnym procesie spermatogenezy. Przeprowadzone przez autorów badania potwierdzają ponadto niekorzystny wpływ preparatów o działaniu cytostatycznym na większość ocenianych parametrów odporności komórkowej u psów. Zastosowane w doświadczeniu preparaty różnią się zasadniczo swoim mechanizmem działania, co ma odzwierciedlenie w wynikach. Tamoksifen, jako antyestrogen wpływał immunosupresyjnie po dłuższym okresie jego stosowania, początkowo może nawet podwyższać odporność komórkową u psów. Cyclofosfamid jest bardziej toksyczny a jego działanie obniżające odporność jest o wiele silniejsze i widoczne już po krótkim okresie stosowania. Informacje te są istotne przy terapii cytostatykami i doborze odpowiedniego preparatu oraz ewentualnej terapii wspomagającej, łagodzącej negatywne oddziaływanie wymienionych cytostatyków.

1. **Brodzki P**, Wrona Z, Krakowski L, Brodzki A, Łopuszyński W. Wpływ podawania cyclofosfamidu na jakość nasienia psów samców. *Medycyna Weterynaryjna* 2007, 63, 439-443.
2. **Brodzki P**, Wrona Z, Krakowski L, Brodzki A. Influence of tamoxifen on sexual impulse and semen biological values in male dogs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2007, 51, 383-391.
3. **Brodzki P**, Wrona Z, Piech T, Brodzki A. Effects of cytostatics on the selected parameters of cell mediated immunity in dogs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2011, 55, 87-93.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych, w dalszym ciągu rozwijałem swoje zainteresowania badawcze w zakresie andrologii oraz rozrodu zwierząt gospodarskich i towarzyszących. Największą uwagę w tym okresie poświęciłem diagnostyce zaburzeń płodności w stadach krów mlecznych, czego efektem są publikacje zaliczone do „osiągnięcia naukowego” w postępowaniu habilitacyjnym, a także inne prace dotyczące problemów w rozrodzie krów mlecznych. Bardzo istotna, podczas tego okresu była współpraca, z Panem prof. dr hab. Krzysztofem Kostro z Katedry Epizootiologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, który nie tylko umożliwił mi wykonanie wielu badań, ale również ukierunkował moje postępowanie w tym zakresie.

Rozpoznanie przyczyny niepłodności, jest podstawą do podjęcia postępowania leczniczego lub eliminacyjnego. Należy w tym miejscu nadmienić, że ze względu na wieloczynnikowe pochodzenie niepłodności, ustalenie takiej przyczyny nie zawsze jest możliwe. Do głównych grup przyczynowych zaburzających płodność u krów należą, stany zapalne macicy, nieprawidłowości cyklu jajnikowego oraz błędy żywieniowe i związane z nimi niedobory (lub nadmiary) mineralno-witaminowe, energetyczne czy białkowe. Najwięcej jednak problemów z płodnością u krów wynika z prostych błędów technicznych takich jak, brak rozpoznania objawów rujowych, inseminacja nasieniem złej jakości, złą metodą lub też inseminacja w nieodpowiednim czasie. Odnalezienie przyczyny niepłodności wymaga często użycia wielu metod diagnostycznych jednocześnie. Jedną z tych metod jest cytologia macicy. Jest ona prostą a zarazem bardzo skuteczną metodą służącą nie tylko do rozpoznawania podklinicznych stanów zapalnych macicy, ale również może być bardzo pomocna w rozpoznawaniu faz cyklu jajnikowego, a nawet niektórych patologii jajników. Ocena stanu endometrium macicy może, zatem ułatwić zarówno rozpoznanie rui, co ma duże znaczenie przy braku objawów rujowych w tzw. cichej rui u krów, oraz w różnicowaniu cyst jajnikowych. Dlatego też badanie cytologiczne, jest bardzo dobrym uzupełnieniem do badania ultrasonograficznego. Badanie bakteriologiczne macicy, jest również jedną z podstawowych metod wykorzystywaną w diagnostyce zaburzeń płodności u krów mlecznych i służy do identyfikacji drobnoustrojów odpowiedzialnych za infekcję macicy oraz do ustalenia ich lekowrażliwości. Badanie to

powinno stanowić podstawę wyboru postępowania leczniczego, w przypadku występujących zapaleń macicy. Zastosowanie tych metod w praktyce zostało przedstawione w następujących publikacjach:

1. **Brodzki P**, Brodzki A, Kostro K, Kurek Ł, Marczuk J, Krakowski L. Cytological image of the endometrium in cows in follicular and luteal phases of the ovarian cycle and in cows with follicular and luteal ovarian cysts. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2014, 58, 141-147.
2. **Brodzki P**, Brodzki A, Kurek Ł, Marczuk J, Tatarska MR. Endometrial cytology at luteal and follicular phases of the ovarian cycle in cows. Annals of Animal Science 2015, 1, 107-117.
3. **Brodzki P**, Brodzki A, Kurek Ł, Marczuk J, Tatarska MR. Reproductive system condition in dairy cows with left-sided displacement of the abomasums. Annals of Animal Science 2015, 2, 359-371.
4. **Brodzki P.**, M. Bochniarz, A. Brodzki, Z. Wrona, W. Wawron. *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* as an aetiological factor of endometritis in cows and the susceptibility of these bacteria to selected antibiotics. Polish Journal of Veterinary Science 2014, 4, 657–664.

Istotnymi badaniami z zakresu zaburzeń płodności, były również prace dotyczące mechanizmów immunologicznych występujących podczas ropomacicza. Pyometra podobnie jak inne rodzaje stanów zapalnych macicy, może stanowić poważny problem w stadach krów mlecznych i powodować duże straty ekonomiczne, związane nawet z koniecznością brakowania zwierząt z powodu niepłodności. Ropomacicze u krów może występować w różnych okresach laktacji, jednak najczęściej występuje powyżej 6 tyg. po porodzie, do czego predysponuje wczesna owulacja i wytworzenie się aktywnego ciała żółtego. Ropomacicze charakteryzuje się gromadzeniem ropnej lub ropno - śluzowej wydzieliny w jamie macicy, będącej efektem zakażeń bakteriami chorobotwórczymi, które indukują stan zapalny endometrium. Charakterystyczną cechą dla pyometry jest obecność ciała żółtego na jajniku, które utrzymuje się dłużej niż w fazie lutealnej cyklu jajnikowego. Związane jest to z osłabioną produkcją luteolitycznej prostaglandyny  $PGF_{2\alpha}$ , a wzmożoną produkcją prozapalnej  $PGE_{2\alpha}$ , przez endometrium objęte procesem zapalnym. Dodatkowo przetrwale ciało żółte na jajniku produkuje progesteron odpowiedzialny za utrzymanie zamkniętej szyjki macicy i brak ewakuacji wydzieliny zapalnej. Jedynie niekiedy następuje częściowe otwarcie szyjki macicy i wówczas obserwuje się nieznaczny stopień wypływu ropny z dróg rodnych. W eliminacji infekcji macicy podstawową rolę odgrywają komórkowe i humoralne mechanizmy nieswoistej i swoistej miejscowej odporności przeciwwakaźnej, a sprawność ich

wydaje się mieć kluczową rolę zarówno w powstawaniu jak i likwidacji pyometry u krów. Wyniki badań własnych w tym zakresie, wnoszą nowe dane odnośnie mechanizmów determinujących powstawanie i utrzymywanie się ropomacicza u krów pomiędzy 70 a 90 dniem po porodzie. Wykazano, że u krów z ropomaciczem występuje istotny spadek aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów w macicy, wzrost odsetka limfocytów TCD8 supresorowych a także spadek odsetka limfocytów regulatorowych o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Ponadto w wypłuczynach z macicy, wykazano również istotnie wyższy poziom TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 oraz Hp u krów z pyometrą w porównaniu do krów zdrowych. Ponadto wykazano również, że u krów z pyometrą stężenie IL-10 było prawie dwukrotnie wyższe w wypłuczynach z macicy niż w surowicy krwi. Opisane zależności wskazują na osłabienie mechanizmów miejscowej odporności macicy i może umożliwiać intensywne namnażanie się patogenów, będących jedną z głównych przyczyn ropomacicza. Do prac tych należą:

1. **Brodzki P**, Kostro K, Brodzki A, Niemczuk K, Lisiecka U. Cytometric analysis of surface molecules of leucocytes and phagocytic activity of granulocytes and monocytes/macrophages in cows with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals* 2014, 49, 858-864.
2. **Brodzki P**, Kostro K, Brodzki A, Ziętek J. The concentrations of inflammatory cytokines and acute-phase proteins in the peripheral blood and uterine washings in cows with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals* 2014, 50, 417-422.

Moje zainteresowania naukowe oraz praktyczna współpraca z hodowcami bydła mlecznego, pozwoliły również na pomoc w badaniach prowadzonych w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt oraz Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, dotyczących zapaleń gruczołu mlekowego oraz jakości higienicznej mleka trafiającego do konsumentów w punktach sprzedaży bezpośredniej.

Zapalenie gruczołu mlekowego u krów (*mastitis*) jest jednym z najczęściej występujących schorzeń u bydła mlecznego i stanowi poważny problem ekonomiczny związany z ograniczeniem produkcji mleka oraz braku jego przydatności do celów konsumpcyjnych. Główną przyczyną *mastitis* są bakterie chorobotwórcze z grupy paciorkowców, gronkowców, *E. coli* oraz grzybów. Drobnoustroje te dostają się do wymienia, najczęściej drogą wstępującą przez kanał strzykowy do tkanki gruczołowej, gdzie namnażają się oraz wydzielają toksyny, które mogą być przyczyną niejednokrotnie silnie wyrażonych miejscowych, a nawet ogólnych objawów klinicznych. W zależności od czynnika etiologicznego oraz stanu odporności, zapalenie gruczołu mlekowego może przebiegać w postaci klinicznej (*mastitis clinica*) lub subklinicznej (*mastitis subclinica*).

Brak odpowiedniej kontroli i monitorowania stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego, zwłaszcza pod kątem możliwości występowania subklinicznych przypadków zapaleń wymienia, ale również odpowiedniej higieny na etapie pozyskiwania mleka, może być przyczyną obecności szkodliwych drobnoustrojów w spożywanym mleku. Wyniki badań własnych, we wszystkich ocenianych punktach sprzedaży bezpośredniej, wykazały przekroczenie międzynarodowych standardów w zakresie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych w 1 ml mleka. Ponadto w badanych próbkach mleka surowego wykazano obecność drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*, rodzaju *Enterococcus* (paciorkowców kałowych) oraz *E. coli*. Ponadto niepokojąca jest również, wykazana obecność drobnoustrojów chorobotwórczych (*L. monocytogenes*, *Staph. aureus*), stanowiących bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

1. Piech T, Wawron W, Bochniarz M, Krakowski L, **Brodzki P**. Antibiotic resistance of pathogens isolated from bovine mastitis casus. *Medycyna Weterynaryjna* 2015, 71, 114-117.
2. Bochniarz M, Wawron W, Szczubiał M, **Brodzki P**, Piech T, Kusy R. Characteristics of *Staphylococcus xylosus* isolated from subclinical mastitis in cows. *Annals of Animal Science* 2014, 14, 859-867.
3. Piech T, **Brodzki P**. Wpływ stymulacji methizopriolem na jakość higieniczną mleka surowego krów. *Medycyna Weterynaryjna* 2009, 65, 844-847.
4. Pysz-Lukasik R, Paszkiewicz W, Tatarska MR, **Brodzki P**, Bełkot Z. Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. *Journal of Dairy Science* 2015, 98, 4294-4301.

Moje zainteresowanie chorobami nowotworowymi oraz dobra współpraca z Katedrą i Kliniką Chirurgii Zwierząt, pozwoliły na przeprowadzenie wspólnych badań dotyczących diagnostyki, leczenia oraz oceny skuteczności antyhormonalnego leczenia, nowotworów gruczołów przyodbytowych u psów samców. Przeprowadzone badania wykazały, że terapia antyhormonalna guzów gruczołów okołoodbytowych, jest bezpieczną i skuteczną metodą leczenia zachowawczego, szczególnie w odniesieniu do nowotworów niezłośliwych. Natomiast w przypadku nowotworów złośliwych celowe jest uzupełnienie postępowania resekcją zmian nowotworowych. Wykazano również, że profil wolnych aminokwasów w surowicy krwi u psów z chorobą nowotworową posiada wartość diagnostyczną i stanowi uzupełnienie diagnostyki histologicznej nowotworów gruczołów okołoodbytowych. Ocena poziomu magnezu w surowicy krwi psów leczonych preparatami antyhormonalnymi jest przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu skuteczności leczenia zachowawczego nowotworów okolicy

okołodbytowej. Zawartość antygenu Ki-67 w tkance nowotworowej gruczołów okołodbytowych ściśle koreluje ze stopniem złośliwości, co może być wykorzystane w diagnostyce różnicowej oraz w prognozowaniu skuteczności zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w surowicy krwi psów z nowotworami złośliwymi jest istotnie wyższa, w porównaniu do nowotworów niezłośliwych. Kształtowanie się aktywności antyoksydacyjnej po zastosowaniu leczenia przeciw hormonalnego szczególnie w odniesieniu do nowotworów złośliwych gruczołów okołodbytowych, jest wskazaniem do suplementacji antyoksydantami w celu zwiększenia skuteczności leczenia zachowawczego. Niski poziomu cynku w surowicy psów z nowotworami złośliwymi jest wynikiem zwiększonego jego zapotrzebowania przez komórki nowotworowe ze względu na wzrost ich metabolizmu i aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych, zależnych od stężenia jonów cynku. Wyniki tych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Brodzki A, **Brodzki P**, Szpetnar M, Tataro MR. Serum concentration of free amino acids in dogs suffering from perianal tumours. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013, 57, 47- 52.
2. Brodzki A, Tataro MR, **Brodzki P**. Serum concentration of magnesium in dogs suffering from tumors of the perianal glands. Magnesium Research 2013, 26, 87-92.
3. Brodzki A, Łopuszyński W, **Brodzki P**, Tataro MR. Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. Folia Biologica 2014, 62, 235-241.
4. Brodzki A, Sobczyńska-Rak A, **Brodzki P**, Tataro MR, Silmanowicz P. Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów odbytu u psów samców. Medycyna Weterynaryjna 2014, 70, 585-648.
5. Brodzki A, **Brodzki P**, Tataro MR, Kostro K. Total antioxidative status and zinc concentration in dogs suffering from perianal tumors. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2015, 57, 47- 52.

Płodność u samców, w dalszym ciągu pozostaje w gestii moich zainteresowań, a ściśle współpraca z innymi pracownikami naukowymi zajmującymi się tą tematyką, pozwalała na przeprowadzenie ciekawych badań dotyczących płodności samców różnych gatunków zwierząt. Z badań wykonanych u knurów wynika, że jakość nasienia u samców tego gatunku wykorzystywanych w stacjach unasienniania, jest zależna od pory roku, w której nasienie jest pozyskiwane. Pod względem morfologii

stored in winter months it exhibits the highest percentage of sperm cells with damaged genetic material. Another study conducted on stallion semen demonstrated, that the assessment of the cellular membrane integrity of sperm cells and sperm cell DNA defragmentation, is useful in the determination if and for how long stallion semen diluted and cooled to +4°C can be used for mare insemination. Study conducted on dogs with benign prostatic hyperplasia demonstrated, that this disease does not affect the biochemical composition of prostate secretion, and also does not influence semen quality in a negative way, and, as a result, fertility of male dogs. The discussed issues are presented in the following publications.

1. **Brodzki P**, Wrona Z, Klimont M, Krakowski L. Morphological characteristics of boar spermatozoa in the annual production cycle. *Medycyna Weterynaryjna* 2015, 71, 109–113.
2. Klimont M, Wrona Z, **Brodzki P**, Krakowski L. Influence of season and storage of semen of Bosra on the degree of DNA fragmentation of sperm. *Medycyna Weterynaryjna* 2015, 71, 171–175.
3. Krakowski L, Piech T, **Brodzki P**, Sławińska-Brych A, Tataro MR, Bartoszek J. Quality of cooled semen of cold-blooded stallions evaluated with the use of apoptosis and DNA defragmentation markers. *Medycyna Weterynaryjna* 2014, 70, 572–577.
4. Krakowski L, Wąchocka A, **Brodzki P**, Wrona Z, Piech T, Wawron W, Chałabis-Mazurek A. Sperm quality and selected biochemicals parameters of seminal fluid in dogs with benign prostatic hyperplasia. *Animal Reproduction Science* 2015, 160, 120–125.

*Piotr Brodzki*