

**dr inż. Alicja Dratwa-Chałupnik**

**AUTOREFERAT**

**dotyczący działalności naukowo – badawczej**

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

### 1. Dane personalne:

Imię i nazwisko: **Alicja Dratwa-Chałupnik**

Miejsce pracy: **Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki**  
**Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt**  
**Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie**  
**ul. Doktora Judyma 26,**  
**71-466 Szczecin**

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

1996 r. stopień magistra nauk rolniczych w zakresie zootechniki (specjalność: fizjologia zwierząt) Akademia Techniczno–Rolnicza w Bydgoszczy, Wydział Zootechniczny; praca magisterska nt. *„Wpływ dodatku metioniny i lizyny do karmy na niektóre wskaźniki hematologiczne oraz na poziom trijodotyroniny u rosnących perlic domowych”*, promotor: dr inż. Romuald Rajs.

2004 r. stopień doktora nauk rolniczych w zakresie zootechniki (specjalność: fizjologia zwierząt) Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Fizjologii Zwierząt; praca doktorska nt. *„Przedśionkowy peptyd natriuretyczny a czynność nerek cieląt noworodków”*, promotor: prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak (zarówno rozprawa doktorska jak i obrona pracy zostały wyróżnione).

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

1996 – 1999r. Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Zootechniczny, Akademia Techniczno–Rolnicza w Bydgoszczy (obecnie: Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno–Przyrodniczy)  
stanowisko: starszy technik w pracowni izotopowej; określanie stężenia hormonów w surowicy krwi przy użyciu zestawów izotopowych oraz wykonywanie analiz biochemicznych, dodatkowo prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotu fizjologia zwierząt.

1999 – 2003 r. Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie (obecnie: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny)  
stanowisko: doktorantka; wykonywanie pracy doktorskiej, prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów kierunków studiów: Biologia, Biotechnologia, Zootechnika i Rolnictwo (studia stacjonarne i zaoczne).

- 2004 – 2005 r.      Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie (obecnie: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny)  
stanowisko: asystent z doktoratem; uczestnictwo w realizacji tematów badawczych prowadzonych w Katedrze, wykonywanie analiz laboratoryjnych i publikowanie uzyskanych wyników badawczych, prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów kierunków studiów: Biologia, Biotechnologia, Zootechnika i Rolnictwo (studia stacjonarne i zaoczne).
- 2005 – 2008 r.      Katedra Fizjologii i Cytobiologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie (obecnie: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny)  
stanowisko: adiunkt  
(30.01.2008 – 03.06.2008 – urlop macierzyński)
- 2009 r. – obecnie    Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
stanowisko: adiunkt

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

a. Tytuł osiągnięcia naukowego, monografia habilitacyjna pt.:

**„Wpływ dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego na profile białkowe osocza krwi i moczu oraz nerkowe mechanizmy regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt”**

Szczecin 2014

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

b. Syntetyczne omówienie rozprawy habilitacyjnej

Pourodzeniowym procesom adaptacji, wzrostu i dojrzewania towarzyszy nasilenie zachorowań i znaczna śmiertelność cieląt. Przyczyny śmiertelności neonatalnej są złożone, często ma ona podłoże polietiologiczne, u podstaw, której leżą zaburzenia homeostazy wodno-elektrolitowej.

Istotnym czynnikiem sprzyjającym utracie wody i elektrolitów wraz z kałem jest gromadzenie się w przewodzie pokarmowym niestrawionych dwucukrów (laktozy). Przekroczenie 55% udziału laktozy w preparacie mlekozastępczym, ze względu na jej właściwości osmotyczne, istotnie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia biegunki.

Między stanem gospodarki wodno-elektrolitowej a czynnością nerek istnieje wzajemna zależność. W regulacji czynności nerek noworodków cieląt istotną rolę odgrywają hormony: przedsiorkowy peptyd natriuretyczny, wazopresyna oraz składowe układu renina-angiotensyna-aldosteron.

Metody badawcze, stosowane dotychczas w ocenie zmian procesów fizjologicznych i ich zaburzeń opierały się na analizie biochemicznej krwi i moczu. Wykorzystanie metod proteomicznych, umożliwia dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych, mechanizmów regulacji ekspresji białek na poziomie translacji. Metody proteomiczne mogą znaleźć zastosowanie np. w diagnostyce zaburzeń wodno-elektrolitowych i przyczynić się do wskazania kierunków działań prewencyjnych i profilaktycznych podczas chowu nowonarodzonych cieląt.

W prezentowanej pracy wykonano badania proteomiczne, które łączą metody biochemiczne, fizykochemiczne i bioinformatyczne, co daje możliwość równoczesnej analizy wszystkich białek obecnych w komórce, tkance oraz płynach ustrojowych. Całościowa analiza proteomu różni się od klasycznie stosowanych technik biochemicznych, umożliwiających identyfikację i charakterystykę jedynie pojedynczych białek. Proteom ulega nieustannym zmianom w odpowiedzi na czynniki wewnątrzustrojowe lub środowiskowe, dlatego wyniki analiz proteomicznych danego systemu biologicznego dostarczają informacji o poziomie ekspresji i aktywności białek w określonym czasie.

Wysokospecjalistyczne techniki wykorzystywane w proteomice dają możliwość kompleksowej analizy ilościowej polipeptydów i ich identyfikację. W prezentowanej pracy wykorzystano elektroforezę dwukierunkową (rozdział białek) w połączeniu ze spektrometrią mas (identyfikacja białek), która należy do najpopularniejszych narzędzi wykorzystywanych w analizach proteomicznych. Wyżej opisane techniki analityczne są stosowane w badaniach z zakresu proteomiki ekspresyjnej, w których analizuje się obecność białek występujących w danym układzie biologicznym oraz zmian ich ekspresji pod wpływem określonych czynników, w tym doświadczalnych. Istotą badań proteomicznych jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych (komórek, tkanek, płynów ustrojowych) na przykład pomiędzy osobnikami zdrowymi i chorymi. Analiza zmian występujących w proteomach pod wpływem działania określonego czynnika (np. leku, zmodyfikowanej diety, stresu, zmiany środowiska) umożliwia wyodrębnienie białek kluczowych dla badanych procesów biologicznych. Analizy proteomiczne umożliwiają również wyszukiwanie białek różniących się ekspresją, które mogą stanowić wskaźniki zmian procesów zachodzących w organizmie.

Narzędzia proteomiczne w badaniach fizjologii zwierząt gospodarskich są coraz częściej stosowane, czego wyrazem jest wzrost liczby publikacji dotyczących zmian profili białkowych komórek, tkanek oraz płynów ustrojowych tych zwierząt. W ostatnich latach utworzono mapy białkowe tkanek i płynów ustrojowych bydła, w tym nerek, wątroby, mięśni poprzecznie prążkowanych, osocza (surowicy) krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, a także erytrocytów i neutrofilów. Mocz jest płynem ustrojowym, którego duże ilości można pozyskać w sposób nieinwazyjny. Od wielu lat jest on wykorzystywany w diagnostyce weterynaryjnej do oceny zdrowia zwierząt. Mimo, że mocz jest stosunkowo łatwo pozyskiwanym materiałem badawczym, obecnie dostępnych jest kilka prac z zakresu proteomiki moczu zwierząt gospodarskich.

Analizy proteomiczne są wieloetapowe. Pierwszym ważnym etapem analiz proteomicznych jest przygotowanie materiału biologicznego do analiz. Nie istnieje jeden uniwersalny sposób postępowania z preparatem biologicznym. Każdy materiał biologiczny wymaga zastosowania odrębnej procedury, którą opracowuje się pod daną metodę proteomiczną. I tak przygotowanie osocza krwi do prezentowanych analiz proteomicznych wymagało m.in. zredukowania białek występujących w nadmiarze (albuminy, immunoglobuliny), w celu uzyskania na obrazie elektroforetycznym białek występujących w mniejszym stężeniu. W przypadku próbek moczu konieczne było przystosowanie metody zagęszczania tego płynu ustrojowego (aby uzyskać takie stężenie białek, które umożliwi ich rozdział elektroforetyczny) oraz dobranie najskuteczniejszej metody pozbawiającej substancji utrudniających rozdział elektroforetyczny. Opracowane dla prezentowanych badań etapy przygotowania danego materiału biologicznego oraz etapy elektroforezy dwukierunkowej i barwienia żeli 2D nie zmieniały się w celu uzyskania powtarzalnych wyników badań.

Podjęte badania miały na celu określenie wzoru zmian profili białkowych badanych płynów ustrojowych oraz hormonów i wskaźników biochemicznych osocza krwi cieląt w pierwszym tygodniu ich życia w odpowiedzi na krótkotrwałe dodawanie laktozy do preparatu mlekozastępczego. Znajomość charakteru zmian badanych wskaźników (białkowych, humoralnych i biochemicznych) w płynach ustrojowych, wynikających z nadmiernego udziału laktozy w diecie, może przyspieszyć znalezienie przyczyn (lub przyczyny) zaburzeń wodno-elektrolitowych obserwowanych u cieląt w tym okresie życia.

Głównym zamierzeniem podjętych badań było:

- a) identyfikacja różnic w profilach białkowych osocza krwi oraz moczu cieląt przed krótkotrwałym dodawaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego i po jej dodaniu oraz odniesienie różnic w ekspresji białek do procesów fizjologicznych, w które białka te są zaangażowane;

- b) ocena udziału przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), aldosteronu (ALDO) i wazopresyny (AVP) w regulacji bilansu wodno-elektrolitowego przed podaniem preparatu mlekozastępczego z laktozą i po jego podaniu;
- c) analiza stężenia wybranych parametrów biochemicznych krwi (ANP, ALDO, AVP, białka całkowitego, albuminy, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, P<sub>i</sub>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, glukozy, mocznika, kreatyniny) przed zastosowaniem diety z dodatkiem laktozy i po jej zastosowaniu;
- d) poszukiwanie u tygodniowych cieląt po zastosowaniu dodatku laktozy ewentualnych zależności pomiędzy białkami osocza krwi i moczu wykazujących zmiany w ekspresji a wybranymi wskaźnikami biochemicznymi osocza krwi.

Uzyskane wyniki wykazały, że krótkotrwałe, dodanie laktozy w ilości 1g·kg<sup>-1</sup> masy ciała do preparatu mlekozastępczego tygodniowym cielętom powoduje istotne zmiany profilu białkowego osocza krwi i moczu.

Można wnioskować, że dodatek laktozy do standardowej diety tygodniowych cieląt powoduje zmniejszenie ekspresji białek osocza krwi biorących udział w procesach wrodzonej odporności immunologicznej (subkomponent C1r) oraz zaangażowanych w odpowiedź ostrej fazy (fibrynogen, glikoproteina alfa-1-B), a także wpływa na zmianę ekspresji białek działających ochronnie i przeciwzapalnie: glikoproteina alfa-2-HS (wzrost ekspresji) i adiponektyny (wzrost oraz obniżenie ekspresji w zależności od izoformy tego białka) oraz zmniejsza ekspresję glikoproteiny alfa-1-B.

U tygodniowych cieląt, w odpowiedzi na dodanie laktozy do preparatu mlekozastępczego obserwuje się zmniejszenie ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie hemostazy organizmu: izoforma X1 łańcucha alfa fibrynogenu, izoforma X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia, łańcuch XIII A czynnika krzepnięcia.

Dodanie do preparatu mlekozastępczego laktozy przyczyniło się do zwiększenia ekspresji białek moczu: albuminy surowiczej, preproklusteryny oraz pęcherzykowego integralnego białka błonowego VIP36 związanego z sekrecją klusteryny, które są wskaźnikami sprawności kanalików nerkowych.

Duże stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego i jego zmiany w osoczu krwi cieląt w odpowiedzi na dodatek laktozy do diety mogły mieć związek ze zmianami ekspresji izoform adiponektyny w osoczu krwi.

Pomiędzy przedsionkowym peptydem natriuretycznym, wazopresyną i aldosteronem istnieje współzależność czynnościowa, która skutecznie reguluje bilans wodno-elektrolitowy tygodniowych cieląt w odpowiedzi na dodatek laktozy (1g na 1kg m.c.) do preparatu mlekozastępczego. Działanie hormonów potwierdza stabilne stężenie potasu i chlorków w osoczu krwi cieląt oraz powrót w ostatnich dwóch dniach

doświadczenia stężenia sodu do poziomu obserwowanego przed podaniem laktozy do diety, a także stabilna wartość ciśnienia osmotycznego osocza krwi w czasie doświadczenia.

Po pobraniu przez cielęta preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy obserwowano również zmiany stężenia niektórych mikro- i makroelementów osocza krwi. Dodanie laktozy zwiększyło stężenie we krwi fosforu nieorganicznego i magnezu, zmniejszyło natomiast stężenie wapnia i cynku. Nie wykazano wpływu podania laktozy na stężenie żelaza i miedzi.

U tygodniowych cieląt, podanie laktozy w ilości 1g na 1kg masy ciała wraz z preparatem mlekozastępczym powoduje zmiany stężenia parametrów biochemicznych istotnych dla rozwijającego się noworodka. Wykazano zmniejszenie stężenia białka całkowitego oraz albuminy (białka ostrej fazy) w osoczu krwi w odpowiedzi na podanie laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym. Mniejsze stężenie albuminy w osoczu krwi wynikało ze zwiększenia wydalania tego wskaźnika wraz z moczem, wykazane jako wzrost ekspresji tego białka w moczu cieląt po podaniu laktozy. Nie obserwowano zmian stężenia parametrów biochemicznych mówiących o przemianach związków azotowych i odzwierciedlających czynność nerek: mocznika i kreatyniny.

Wykorzystane, w prezentowanych badaniach, metody proteomiczne, umożliwiły dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych oraz ocenę zmian procesów fizjologicznych zachodzących u cieląt poddanych działaniu diety z dodatkiem laktozy. Wyniki proponowanych badań mogą stanowić wsparcie diagnostyczne i prognostyczne, w profilaktyce i/lub prewencji zootechniczno-weterynaryjnej.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych**

Główne kierunki moich badań naukowych są związane z fizjologią okresu neonatalnego zwierząt gospodarskich (zwłaszcza cieląt). Dotyczą one przede wszystkim gospodarki wodno-mineralnej, a zwłaszcza funkcjonowania nerek i mechanizmów regulujących ich czynność. Obecnie publikuję prace wykorzystujące metody proteomiczne umożliwiające dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych, mechanizmów regulacji białek na poziomie translacji.

Zakres tematyczny prac naukowo-badawczych obejmuje następujące zagadnienia:

1. Fizjologia nerek noworodków zwierząt gospodarskich, głównie cieląt, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w regulacji homeostazy wodno-elektrolitowej.
2. Hormonalna regulacja czynności nerek cieląt w okresie neonatalnym.

3. Zmiany wskaźników fizjologicznych, biochemicznych i hormonalnych krwi cieląt w okresie pourodzeniowym.
4. Wpływ zaburzeń wodno-elektrolitowych (nadmierna podaż laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym) na bilans wodno-elektrolitowy, wybrane wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i fizjologiczne u cieląt w okresie neonatalnym.
5. Analiza profili białkowych tkanek i płynów ustrojowych młodych zwierząt gospodarskich oraz prace o charakterze metodycznym i przeglądowym dotyczące badań z zakresu proteomiki.

1. *Fizjologia nerek noworodków zwierząt gospodarskich, głównie cieląt, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w regulacji homeostazy wodno-elektrolitowej.*

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4, w następujących pozycjach: B.1.1; B.1.5; B.1.7; B.1.13; B.1.15; B.1.20; B.1.21; B.2.30; B.2.32; B.2.46.

Szybka i sprawna adaptacja organizmu w okresie pourodzeniowym jest warunkiem przeżycia i prawidłowego rozwoju. Zmiany przystosowawcze dotyczą wszystkich narządów i układów, zwłaszcza tych, których czynność w okresie życia płodowego była ograniczona. Zmianom tym podlegają również nerki, główny narząd wydalniczy odpowiedzialny za regulację środowiska wodno-elektrolitowego i kwasowo-zasadowego organizmu. W prowadzonych badaniach wykazano, że u cieląt i koźląt najintensywniejsze zmiany przystosowawcze układu wydalniczego zachodzą w pierwszym tygodniu życia.

U cieląt (od 1 do 7 dnia życia) wykazano niskie wartości przepływu krwi i osocza przez czynny miąższ nerkowy oraz niską wartość filtracji kłębkowej osocza krwi (w porównaniu do wartości obserwowanych u osobników dorosłych) i wzrost tych wartości wraz z wiekiem. U cieląt (w przeciwieństwie do osobników dorosłych) nie obserwowano równoległych zmian przepływu (osocza) krwi do wielkości filtracji kłębkowej.

Wykazano, że natriureza u cieląt w pierwszym tygodniu życia jest w większym stopniu zależna od zmian resorpcji w kanalikach nerkowych a w mniejszym od zmian hemodynamiki w nerkach. U cieląt w pierwszym tygodniu życia eliminacja potasu drogą nerkową zależy przede wszystkim od wielkości resorpcji tego elektrolitu w kanalikach nerkowych. Zmiany wielkości ładunku przesączonego potasu odgrywają mniejszą rolę w regulacji wydalania. W pierwszym tygodniu życia cieląt obserwowano istotne zmiany wielkości ładunku przesączonego, resorpcji kanalikowej oraz wydalania chlorków z moczem.



Analiza zmian wielkości ładunku przesączonego chlorków wskazała, że zmiana stężenia chlorków w osoczu krwi nie miała wpływu na ten wskaźnik. Stwierdzono, że decydującym mechanizmem regulującym wydalanie chlorków z moczem są zmiany wielkości resorpcji tego elektrolitu w kanalikach nerkowych. Nerki cieląt wykazały dużą sprawność w regulowaniu równowagi elektrolitowej krwi. Najbardziej dynamiczne zmiany czynnościowe tego narządu zachodziły w pierwszych trzech dniach życia cieląt. Potwierdzono dużą zdolność nerek cieląt do regulacji gospodarki wodnej. Nie mniej jednak na podstawie analizy ekspresji akwaporyny 2 (AQP2) w moczu cieląt stwierdzono, że nerkowe wydalanie tego białka i tym samym zdolność do kanalikowej resorpcji wody u tych noworodków jest niższa w porównaniu z osobnikami dorosłymi. Sugerowano, że brak powiązania pomiędzy wzrostem ekspresji AQP2 a ciśnieniem osmotycznym moczu obserwowane u cieląt może ograniczać zdolność nerek do wytwarzania wysokiego ciśnienia osmotycznego. Określono również lokalizację AQP2 w nerce młodych byczków. Białko to jest ulokowane w komórkach głównych kanalików zbiorczych. Najwyższą ekspresję AQP2 wykazano w części szczytowej błony komórkowej, ponadto ekspresję tego białka wykazano w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych oraz w części podstawno-bocznej błony komórkowej.

Stwierdzono, że u koźląt w okresie neonatalnym występuje białkomocz, który ma charakter selektywny. Obserwowano dynamiczne zmiany udziału poszczególnych frakcji białek w moczu. Wykazano zwiększoną dynamikę zmian w usuwaniu białek o małej masie cząsteczkowej (LMW) co mogło wskazywać nie tylko na zwiększoną przepuszczalność bariery filtracyjnej, zwłaszcza w pierwszych dniach życia ale również na selektywną resorpcję w kanalikach nerkowych. Sugerowano, że zwiększona przepuszczalność bariery filtracyjnej dla białek w pierwszych dniach życia może stanowić mechanizm adaptacyjny do usuwania nadmiernej ilości białek z organizmu. Wskazywano, że zmniejszanie wydalania z moczem białek o masie cząsteczkowej większej od masy cząsteczkowej albuminy, zwłaszcza w pierwszym tygodniu życia koźląt, mogą świadczyć o szybkim i efektywnym uszczelnianiu bariery filtracyjnej. W oparciu o badania, w których porównano wielkości usuwania albumin z moczem u cieląt i koźląt od 1 do 7 dnia życia, stwierdzono, że zdolność adaptacyjna nerek do zatrzymywania albumin w organizmie jest mniejsza u cieląt w porównaniu z koźlętami.

W badaniach nad szczelnością nerkowej bariery filtracyjnej koźląt wykazano, że w pierwszych trzech dniach po urodzeniu zwiększona jest jej przepuszczalność dla białka o masie cząsteczkowej 81 kDa. Stwierdzono, że zwiększone wydalanie białka o tej masie cząsteczkowej świadczyć może o nieszczelności bariery filtracyjnej kłębków nerkowych. Obserwowano, że pourodzeniowe procesy

„uszczelniania” bariery filtracyjnej i usprawniania procesów resorpcyjnych w komórkach nerkowych są rozłożone w czasie i wykazują zmienność osobniczą.

## 2. *Hormonalna regulacja czynności nerek cieląt w okresie neonatalnym.*

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4, w następujących pozycjach: B.1.1; B.1.2; B.1.13; B.1.18; B.2.23; B.2.24; B.2.29; B.2.31; B.2.36; B.2.40; B.2.41.

Czynność nerek jest precyzyjnie regulowana przede wszystkim przez wiele czynników humoralnych. Można je sklasyfikować w dwóch grupach jako natriuretyczne i diuretyczne (rodzina peptydów natriuretycznych w tym urodylatyna syntetyzowana w nerkach) oraz antynatriuryczne i antydiuretyczne (układ renina-angiotensyna-aldosteron, wazopresyna). W badaniach na cielętach w pierwszym miesiącu ich życia obserwowano zmiany głównych hormonów regulujących czynność nerek: przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), aldosteronu (ALDO) i wazopresyny argininowej (AVP). Najwyższe i porównywalne stężenie ANP obserwowano w pierwszym i trzecim tygodniu życia cieląt. Odwrotne zmiany obserwowano przy stężeniu aldosteronu we krwi. Najniższą koncentrację tego hormonu zaobserwowano w trzecim tygodniu życia cieląt (kiedy to stężenie ANP było najwyższe), a najwyższą wartość w drugim tygodniu, przy najniższej koncentracji ANP. Sugerowano, że już w okresie neonatalnym istnieje interakcja pomiędzy tymi dwoma hormonami. Natomiast stężenie AVP w osoczu krwi malało z wiekiem cieląt.

W ramach tego tematu prowadzono badania nad udziałem przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) w regulacji czynności nerek cieląt w pierwszym tygodniu życia. Wyniki badań wskazały na udział ANP w regulacji czynności nerek. Natriuretyczne i diuretyczne działanie tego hormonu „ujawniło się” zwłaszcza w pierwszych trzech dniach po urodzeniu, niemniej stężenie ANP w osoczu krwi cieląt wzrastało do siódmego dnia życia. Stwierdzono, że o udziale ANP w nerkowej regulacji bilansu sodu świadczyć może statystycznie istotny wzrost wydalania tego elektrolitu z moczem oraz obniżająca się jego resorpcja w kanalikach w pierwszych dniach po urodzeniu. Ponadto wskazano, że zmiany wielkości ciśnienia osmotycznego osocza krwi, klirensu osmotycznego, klirensu wody resorpcyjnej i diurezy, w pierwszych dniach życia, mogą wskazywać na diuretyczne działanie ANP. Sugerowano, że brak istotnych zależności pomiędzy stężeniem przedsionkowego peptydu natriuretycznego a większością wskaźników charakteryzujących czynność nerek cieląt od 4 do 7 dnia życia, wskazuje na interakcję hormonów natriuretycznych (diuretycznych) i antynatriuretycznych (antydiuretycznych) w regulacji środowiska wodno-elektrolitowego. Wykazano, że w warunkach

fizjologicznych, przedsionkowy peptyd natriuretyczny nie jest bezpośrednio zaangażowany w regulację resorpcji potasu i chlorków w kanalikach nerkowych cieląt w pierwszym tygodniu ich życia. Sugerowano, że bilans wodno-elektrolitowy w momencie urodzenia jest czynnikiem decydującym o „przewadze” wpływu hormonów, działających natriuretycznie i diuretycznie lub antynatriuretycznie i antydiuretycznie, na regulację czynności nerek cieląt oraz decyduje o adaptacji pourodzeniowej tego narządu.

W badaniach nad wpływem enzymu konwertującego (ACE) na adaptację nerek cieląt w pierwszych siedmiu dniach życia obserwowano wysokie stężenie konwertazy w osoczu krwi, które zmniejszało się wraz z wiekiem zwierząt. Stwierdzono, że konwertaza, poprzez wpływ na układ renina-angiotensyna może modyfikować hemodynamikę nerek, a zwłaszcza wielkość filtracji kłębkowej. Obserwowano przeciwstawne tendencje zmian aktywności reninowej osocza i stężenia ACE. Sugerowano, że zwiększająca się ilość substratu (angiotensyny I) była najprawdopodobniej czynnikiem hamującym uwalnianie ACE ze śródbłonka naczyniowego, w celu utrzymania stężenia angiotensyny II na stałym poziomie. Ponadto, u cieląt w pierwszych 7. dniach życia, po obniżeniu aktywności enzymu konwertującego obserwowano zmniejszanie się wydalania białek z moczem. Wykazano również, że obniżenie aktywności enzymu konwertującego zwiększa stężenie potasu i magnezu w osoczu krwi cieląt oraz zmniejsza stężenie tych pierwiastków w erytrocytach, a także zmniejsza stężenie żelaza w osoczu krwi cieląt. Nie wpływa na zmiany stężenia miedzi w osoczu krwi.

### *3. Zmiany wskaźników fizjologicznych, biochemicznych i hormonalnych krwi cieląt w okresie pourodzeniowym.*

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4, w następujących pozycjach: B.1.3; B.1.4; B.1.6; B.1.14.

U cieląt, zwłaszcza w pierwszym tygodniu życia, wiele parametrów biochemicznych krwi drastycznie zmienia się wraz z wiekiem. Wyniki prowadzonych badań, dostarczyły informacji na temat koncentracji wybranych wskaźników biochemicznych we krwi cieląt w poszczególnych dniach życia. Powyższe może przyczynić się do zwiększenia precyzji interpretacji wyników laboratoryjnych, wczesnego diagnozowania choroby i tym samym ograniczenia śmiertelności neonatalnej.

Najniższą wartość białka całkowitego w osoczu krwi cieląt obserwowano w dniu urodzenia i jego statystycznie istotne zwiększanie w pierwszych 24 godzinach życia. Wzrost stężenia tego wskaźnika po spożyciu pierwszej siary był następstwem wchłaniania w jelicie immunoglobulin z siary. W kolejnych dniach życia stężenie białka całkowitego utrzymywało się na relatywnie stałym poziomie. Wykazano

zmniejszenie się stężenia albuminy w osoczu krwi w 6 godzinie życia cieląt a następnie jej zwiększanie wraz z wiekiem. Sugerowano, że zmniejszenie stężenia tego parametru prawdopodobnie spowodowane było przyjmowaniem pokarmu, które spowodowało przejściowy wzrost objętości osocza krwi.

Natomiast zwiększające się stężenie aminokwasów wraz z wiekiem cieląt najprawdopodobniej spowodował zwiększanie się stężenia albuminy, która wiąże się i przenosi aminokwasy. Wykazane dynamiczne zwiększanie się stężenia mocznika w osoczu krwi cieląt od urodzenia do 3 dnia życia, prawdopodobnie odzwierciedla zwiększoną degradację i dezaminację białek po pobraniu pokarmu bogatego w białka, a także może świadczyć o zwiększonym remodelingu tkanek. Zmniejszanie się stężenia endogennej kreatyniny wraz z wiekiem cieląt wynikało ze zwiększania się wielkości filtracji kłębkowej albo (i) z dynamicznych zmian zachodzących w masie mięśniowej. Wysokie stężenie wapnia w osoczu krwi było powodem wysokiego zapotrzebowania rosnących cieląt na ten makroelement, bowiem wapń odpowiedzialny jest za stymulację wzrostu osteoblastów a zatem i rozwój całego układu kostnego. Sugerowano, że zmniejszanie się stężenia magnezu w osoczu krwi w kolejnych dniach życia był konsekwencją zwiększonej utylizacji tego pierwiastka, a także zmniejszonej jego dostępności w pobieranym pokarmie. Najprawdopodobniej stres pourodzeniowy oraz niskie stężenie cynku w spożywanym pokarmie mógł spowodować zmniejszenie się stężenia tego mikroelementu w osoczu krwi cieląt podczas pierwszej doby życia. Stopniowy wzrost stężenia miedzi w osoczu krwi podczas pierwszych siedmiu dni życia mógł być związany zarówno ze zwiększaniem się stężenia ceruloplazminy jak i wystarczającą podażą miedzi w pobieranym pokarmie.

Wykazano stopniowy wzrost poziomu triglicerydów w osoczu krwi cieląt podczas pierwszych siedmiu dni życia postnatalnego. Obserwowano niską koncentrację cholesterolu całkowitego osocza krwi w dniu urodzenia i szybki wzrost stężenia tego parametru podczas pierwszego tygodnia życia cieląt. Stężenie w osoczu krwi cieląt lipoprotein o dużej gęstości (HDL) i małej gęstości (LDL) zwiększało się wraz z wiekiem cieląt. Wyniki uzyskanych badań jednoznacznie wykazały, że cholesterol przechodzi z LDL do HDL we wczesnym okresie postnatalnym.

Wykazano, różnice w wielkości niektórych wskaźników fizjologicznych w osoczu krwi cieląt karmionych mlekiem oraz preparatem mlekozastępczym. Zmniejszanie się stężenia białka całkowitego oraz albuminy w osoczu krwi cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym było najprawdopodobniej spowodowane niższą strawnością białek zawartych w preparacie mlekozastępczym. Sugerowano, że wykazane większe stężenie mocznika w osoczu krwi cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym w porównaniu z cielętami karmionymi mlekiem matek mógł być wywołany brakiem substancji

biologicznie czynnych, co spowodowało przewagę procesów katabolicznych nad anabolicznymi. Stężenie wapnia w osoczu krwi cieląt zmniejszało się wraz z wiekiem w obu grupach żywieniowych z tym, że koncentracja tego makroelementu była wyższa u cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym. Zmniejszanie się stężenia wapnia we krwi cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym mogło być wywołane obniżaniem się stężenia albuminy w ich krwi. Koncentracja cynku w osoczu krwi cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym była niższa w porównaniu z cielętami karmionymi mlekiem matek. Wykazane różnice mogły wynikać ze zwiększonej zdolności magazynowania tego mikroelementu w wątrobie a także mniejszej biodostępności cynku w preparacie mlekozastępczym w porównaniu z mlekiem. Nie obserwowano różnic w stężeniem sodu i chlorków w osoczu krwi u cieląt z obu grup żywieniowych.

Wiadomym jest, że rytmy biologiczne, rytmy dobowe i sezonowe są kluczowe w adaptacji organizmu do środowiska. W badaniach przeprowadzonych na 2,5 miesięcznych cielętach wykazano, że stężenie melatoniny w osoczu krwi rytmicznie zmienia się w zależności od fazy oświetlenia. Najwyższe stężenie tego hormonu obserwuje się podczas fazy ciemnej. Wykazano, że profil zmian sekrecji melatoniny u cieląt różni się od obserwowanego u osobników dorosłych. Nie wykazano zmian stężenia somatotropiny w zależności od faz oświetlenia oraz korelacji pomiędzy zmianami stężenia obu hormonów w osoczu krwi cieląt w ciągu doby.

#### 4. *Wpływ zaburzeń wodno-elektrolitowych (nadmierna podaż laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym) na bilans wodno-elektrolitowy, wybrane wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i fizjologiczne u cieląt w okresie neonatalnym.*

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4, w następujących pozycjach: B.1.9; B.1.19; B.1.22; B.2.26; B.2.31; B.2.32; B.2.37; B.4.46.

„Rezerwa” czynnościowa nerek noworodków jest bardzo ograniczona, co sprawia, że stosunkowo łatwo dochodzi do zaburzeń równowagi wodno-elektrolitowej. U nowo narodzonych cieląt procesom adaptacji towarzyszy znaczna śmiertelność, w przypadku której największy udział przypisuje się zaburzeniom wodno-elektrolitowym, na skutek utraty wody i elektrolitów podczas biegunek. Przyczyną biegunek mogą być czynniki niezakaźne (np. niewłaściwa higiena zwierząt, nadmierna podaż mleka lub preparatu mlekozastępczego) oraz zakaźne (np. rotawirusy, koronawirusy, enterotoksyczne szczepy *E. coli*). Gromadzenie się w przewodzie pokarmowym niestrawionej laktozy jest istotnym czynnikiem sprzyjającym utracie wody i elektrolitów wraz z kałem.

Badania wykonane u cieląt w pierwszych trzech tygodniach życia wykazały, że nadmierna, krótkotrwała podaż laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym, wywołuje lekką biegunkę. Utrata wody i elektrolitów podczas biegunek powoduje odwodnienie organizmu, co stymuluje system hormonalny regulujący bilans wodno-elektrolitowy organizmu.

U cieląt w pierwszym tygodniu życia, krótkotrwałe podanie laktozy do preparatu mlekozastępczego spowodowało wzrost stężenia przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) w osoczu ich krwi. Sugerowano, że obserwowany wzrost stężenia tego hormonu nastąpił w odpowiedzi na zwiększone wchłanianie sodu z przewodu pokarmowego. Zwiększona podaż laktozy oraz duża aktywność laktazy obserwowana u tygodniowych cieląt mogły wpłynąć na zwiększenie stężenia glukozy w przewodzie pokarmowym, co uruchomiło dodatkowe wchłanianie sodu poprzez kotransporter glukozy i sodu. Sugerowano, że w celu utrzymania stałej ilości sodu we krwi nastąpiło zwiększenie stężenia ANP, którego zadaniem jest zwiększenie wydalania sodu z moczem, a także zahamowanie dalszego wchłaniania sodu w żołądku i jelitach. W konsekwencji obserwowano stabilne stężenie tego elektrolitu w osoczu krwi badanych cieląt. Ponadto, zmniejszenie stężenia aldosteronu (ALDO) w osoczu krwi cieląt po podaniu laktozy, przypuszczalnie miało dodatkowo ograniczyć wchłanianie sodu w okrężnicy. Dodatek laktozy do preparatu mlekozastępczego nie spowodował również zmian w stężeniu potasu i chlorków w osoczu krwi tygodniowych cieląt. U tygodniowych cieląt nie zaobserwowano zmian w koncentracji wazopresyny argininowej po podaniu nadmiaru laktozy w diecie. Podobne obserwacje poczyniono u dwu i trzytygodniowych cieląt.

U trzytygodniowych cieląt obserwowano przeciwstawne tendencje zmian koncentracji aldosteronu (ALDO) i przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) w osoczu ich krwi. Wskazywało to na wzajemne interakcje pomiędzy tymi dwoma antagonistycznie działającymi hormonami w regulacji bilansu sodu, którego stężenie w osoczu krwi u badanych cieląt było stabilne. U dwutygodniowych cieląt natomiast nie obserwowano takiej zależności. Koncentracja aldosteronu we krwi u tych zwierząt utrzymywała się na bardzo wyrównanym poziomie zarówno przed jak i 12. i 36. godzinie po podaniu nadmiaru laktozy w diecie. Natomiast zaobserwowany w 60 godzinie po podaniu nadmiaru laktozy, statystycznie istotny wzrost stężenia ALDO był najprawdopodobniej odpowiedzią na istotny wzrost stężenia potasu we krwi dwutygodniowych cieląt obserwowany w 12. i 36. godzinie po podaniu laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym. Sugerowano, że zaobserwowane w 60. godzinie po podaniu nadmiaru laktozy, zmniejszenie koncentracji potasu w osoczu krwi u dwutygodniowych cieląt, najprawdopodobniej był wynikiem zwiększonego wydalania tego pierwiastka z moczem w odpowiedzi

na zwiększoną koncentrację aldosteronu w tym czasie. Trudno było jednoznacznie wyjaśnić przyczyny wzrostu stężenia sodu w osoczu krwi dwutygodniowych cieląt, po podaniu nadmiaru laktozy, przy jednoczesnym stabilnym stężeniu aldosteronu wykazanym w pierwszych trzech dniach doświadczenia oraz podwyższonej koncentracji ANP po podaniu nadmiaru laktozy. Wskazywano, że wzrost koncentracji tego elektrolitu we krwi badanych cieląt obserwowany po podaży nadmiaru laktozy, mógł być wynikiem zwiększonego poziomu glukozy (pochodzącej z rozpadu z laktozy) w przewodzie pokarmowym, która otworzyła dodatkową drogę dla wchłaniania sodu z przewodu pokarmowego (poprzez kotransporter sód – glukoza). Zarówno u dwu i trzytygodniowych cieląt nie obserwowano znaczących zmian w koncentracji chlorków we krwi po podaży nadmiaru laktozy w diecie. Zaobserwowany, w grupie trzytygodniowych cieląt, statystycznie istotny wzrost stężenia chlorków we krwi w ostatnim dniu doświadczenia, był najprawdopodobniej wynikiem wpływu wieku niż laktozy na te zmiany. Pomimo, zmian w koncentracji potasu we krwi, po podaży laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym, molalność osocza krwi u cieląt z obu grup wiekowych była stabilna. Może to wskazywać na hormonalną sprawność w regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt z biegunką wywołaną nadmierną ilością laktozy w diecie. W oparciu o uzyskane wyniki wysunięto wniosek, że podczas delikatnej biegunki wywołanej nadmierną podażą laktozy, w pierwszym miesiącu życia cieląt, kluczową rolę w utrzymaniu równowagi elektrolitowej krwi odgrywają ANP i aldosteron.

W regulacji bilansu wody istotną rolę odgrywają akwaporyny. W badaniach nad gospodarowaniem wodą i elektrolitami u cieląt w pierwszym miesiącu życia poddanych działaniu nadmiernej ilości laktozy wykazano, że nerkowe usuwanie akwaporyny 2 z moczem znacząco wzrosło pomimo braku zmian w koncentracji wazopresyny lub w ciśnieniu osmotycznym osocza krwi. Sugerowano, że zwiększona ekspresja tego białka może być związana z obniżoną koncentracją wapnia w osoczu krwi cieląt.

U cieląt podczas biegunek obserwuje się różne zmiany koncentracji elektrolitów i minerałów, najprawdopodobniej dlatego, że różne czynniki są przyczyną ich występowania. W omawianych badaniach, tygodniowym, dwutygodniowym i trzytygodniowym cielętom podano do preparatu mlekozastępczego dwukrotnie laktozę w ilości 1g na kg masy ciała. W osoczu krwi cieląt badano zmiany stężenia sodu, potasu, chlorków, wapnia, magnezu, miedzi, cynku, fosforu nieorganicznego i żelaza w odpowiedzi na podaż nadmiaru laktozy. Wykazano, że u wszystkich cieląt z trzech grup wiekowych następuje zmniejszenie się stężenia cynku w osoczu krwi, najprawdopodobniej na skutek strat tego pierwiastka drogą przewodu pokarmowego, podczas biegunek jakie zaobserwowano po podaży laktozy cielętom. Na podstawie uzyskanych wyników sugerowano, że cynk można uznać za potencjalny

wskaźnik diagnostyczny do określenia przyczyny biegunki u cieląt w okresie neonatalnym. Ponadto, nie obserwowano zmian w wartościach wskaźnika hematokrytowego i stężeniu hemoglobiny we krwi u wszystkich cieląt z trzech grup wiekowych.

5. *Analiza profili białkowych tkanek i płynów ustrojowych młodych zwierząt gospodarskich oraz prace o charakterze metodycznym i przeglądowym dotyczące badań z zakresu proteomiki.*

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4, w następujących pozycjach: B.1.6; B.1.8; B.1.9; B.1.10; B.1.11; B.1.12; B.1.16; B.1.17; B.2.24; B.2.25; B.2.27; B.2.28; B.2.33; B.2.34; B.2.35; B.2.38; B.2.39.

Badania proteomiczne płynów ustrojowych, u młodych zwierząt gospodarskich są sporadyczne. W badaniach nad zmianami profilu białkowego osocza krwi cieląt w pierwszych 7. dniach życia wykorzystano połączenie elektroforezy 2-D ze spektrometrią masową typu MALDI-TOF. Obserwowano, że białka osocza krwi ulegały dynamicznym zmianom. Zwłaszcza pobranie pierwszej siary uruchomiło różnorodne fizjologiczne mechanizmy, które przyczyniły się do zmian w profilu białkowym osocza krwi tych zwierząt. Podawanie bogatej w tłuszcz diety (siara, mleko) powodowało wzrost ekspresji białek związanych z transportem lipidów i metabolizmem lipoprotein: apolipoproteiny A-I i apolipoproteiny A-II wraz z wiekiem cieląt. Wzrost ekspresji wspomnianych białek był zgodny ze zmianami stężenia lipidów w osoczu krwi cieląt.

W badaniach na cielętach w pierwszym tygodniu ich życia, wykorzystując elektroforezę jednokierunkową w połączeniu z techniką Western blott, wykazano, że podaż laktozy przyczynia się do wzrostu ekspresji apolipoproteiny A-IV w osoczu krwi. Procesowi temu nie towarzyszyły istotne zmiany we frakcji lipidowej.

Wykorzystując elektroforezę 2-D sprzężoną ze spektrometrem MALDI-TOF poszukiwano białek, których ekspresja w osoczu krwi cieląt zmieniała się po podaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego. U dwutygodniowych cieląt, reakcją na zwiększoną ilość laktozy podawaną wraz z preparatem mlekozastępczym było uruchomienie odpowiedzi ostrej fazy i białek zaangażowanych w ten proces: fibrynogenu (Fb), glikoproteiny alpha-1B (A1BG), alpha-1 antyproteinazy, apoolipoproteiny A-IV (apo A-IV) oraz apolipoproteiny E (apo E). Obserwowane zmiany w ekspresji białek osocza krwi cieląt były skutkiem bezpośredniego oddziaływania nadmiernej podaży cukru (apo A-IV, apo E) lub biegunką obserwowaną po podaży laktozy (Fb, A1BG, alpha-1 antyproteinazy). Sugerowano, że wzór ekspresji białek osocza krwi (zmniejszenie ekspresji: fibrynogenu, apo A- IV oraz zwiększenie



ekspresji: A1BG, antyproteinazy alpha-1 i apo E) dwutygodniowych cieląt poddanych działaniu nadmiernej podaży laktozy może posłużyć do określenia przyczyn biegunki u cieląt.

Posługując się tymi samymi technikami proteomicznymi (2DE i MALDI-TOF), u prosiąt badano wpływ karmienia dietą z dodatkiem 2% inuliny na profil białkowy surowicy krwi. Wykazano, że suplementacja innuliną spowodowała zmiany w ekspresji białek bezpośrednio lub pośrednio zaangażowanych w proces hemostazy oraz biorących udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Sugerowano, że wzrost poziomu fibrynogenu wraz z obniżeniem ekspresji plazminogenu może wskazywać, że dieta wzbogacona fruktanami sprzyja deponowaniu fibryny i krzepnięciu krwi. Obserwowano również wzrost ekspresji witronektyny i podjednostki alfa układu dopełniacza C8, który może chronić organizm gospodarza przed nadmierną aktywnością cytolityczną aktywnego układu dopełniacza. Wykazano również, że prosięta, którym podano inulinę miały nieznacznie zwiększoną koncentrację IgG i IgA, podczas gdy poziom IgM miał tendencję malejącą. Ponadto, dieta bogata w fruktany nie wpłynęła na poziom cholesterolu całkowitego, HDLC, LDLC i triglicerydów w surowicy krwi prosiąt.

W badaniach mających na celu określić dynamikę zmian koncentracji wybranych frakcji białek w osoczu krwi cieląt od 1 do 7 dnia życia, wykorzystano elektroforezę 1-D. Wykazano, że procentowy udział albumin w białku całkowitym osocza krwi obniżał się wraz z wiekiem cieląt. Natomiast stężenie frakcji białek o dużej masie cząsteczkowej wykazywało tendencję wzrostową. Stężenie białek o małej masie cząsteczkowej zwiększało się w pierwszych czterech dniach życia cieląt. Sugerowano, że zmiany stężenia (udziału w białku całkowitym) poszczególnych frakcji białek osocza krwi są zależne przede wszystkim od pokarmu ale także od sprawności wchłaniania jelitowego, natężenia metabolizmu i usuwania białek drogą nerkową. W innych badaniach (wykorzystując 1-DE) wykazano zmniejszanie się usuwania białek z moczem u cieląt od 1. do 7. dnia życia.

Mocz jest stosunkowo łatwo pozyskiwanym materiałem badawczym, mimo to niewiele jest prac z zakresu proteomiki tego płynu ustrojowego u zwierząt gospodarskich. W celu wygenerowania mapy białkowej obrazującej profil białkowy moczu tygodniowych cieląt zastosowano następujące techniki proteomiczne: elektroforezę dwukierunkową (2-DE) w połączeniu ze spektrometrią masową typu MALDI-TOF-TOF oraz elektroforezę jednokierunkową (1-DE) ze spektrometrem ORBITRAP. W wyniku połączenia w/w technik, w moczu badanych cieląt zidentyfikowano 692 różnych białek. W moczu sześciodniowych cieląt zidentyfikowano białka, których obecność wykazano również w osoczu (surowicy) krwi u bydła: 78 kDa – białko regulowane stężeniem glukozy, aktywną cytoplazmatyczną 1,  $\alpha$ -1-antyproteinazę, glikoproteinę  $\alpha$ -2-HS, apolipoproteinę A-I, apolipoproteinę A-IV, apolipoproteinę CIII,

apolipoproteinę E, klusterynę, łańcuch  $\alpha$  fibrynogenu, łańcuch  $\beta$  fibrynogenu, białko 1 podobne do fibrynogenu, gelsolinę, haptoglobinę, stały łańcuch  $\gamma$  1 immunoglobuliny, kininogen-1, kininogen-2, plazminogen, protrombinę, białko wiążące retinol 4, serotransferynę, serpinę A3-1, albuminę osoczną, transtyretynę oraz białko wiążące witaminę D. Ponadto, w moczu zidentyfikowano białka, których obecność wykazano w nerkach bydła: tioesterazę acylo-białkową 1, dehydrogenazę alkoholową, reduktazę aldozy, apolipoproteinę A-I, kalbindynę, anhydrazę węglanową 2, transferazę S glutationu P, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, pokrewne białko szoku cieplnego 71 kDa, peroksyredoksynę-2, kinazę 1 fosfoglicerynianową, albuminę surowiczą, dysmutazę ponadtlenkową (Cu-Zn), izomerazę triozofosforanową i wimentynę.

W moczu cieląt wykazano obecność białka Delta, które łącznie ze swoim białkiem receptorowym Notch uczestniczy m.in. w procesie nefrogenezy. Ponadto w moczu obecne były białka strukturalne oraz zaangażowane w proces przylegania międzykomórkowego, proliferacji i różnicowania komórkowego, które obserwuje się jedynie w moczu zwierząt w okresie neonatalnym: aktyna, łańcuch  $\alpha$ -1 kolagenu, gelsolina, oksydaza lizylova, nidogen 1, osteopontyna i plazminogen. W prezentowanych badaniach proteom moczu zawierał białka związane z rozwojem embrionalnym ssaków, których nie stwierdzono u dorosłych ludzi: ameloblastyny,  $\alpha$ -fetoproteiny, wariantu transkryptu specyficznej fibronektyny płodowej 1, homologu białka Indian hedgehog. W moczu obecne były białka związane z nerkową regulacją bilansu wodno-elektrolitowego: angiotensynogen, enzym konwertujący angiotensynę, akwaporyna 1, ezryna, uromodulina.

Ponadto w proteomie moczu tych cieląt wykazano obecność białek nie związanych z układem wydalniczym a charakterystycznych dla innych tkanek (narządów, układów), m.in. dla układu nerwowego (białka 14-3-3 epsilon, midkiny, białka NAGLU), układu sercowo-naczyniowego (angiogeniny, angiopoetyny, efryny-a1, aminopeptydazy glutamylowe, laktadheryny (BP47), lizosomalnej  $\alpha$ -glukozydazy) oraz układu kostnego (łańcucha kolagenu  $\alpha$ -1(i), białka CTHRC1, glipikanu 3, wydzielniczej fosfoproteiny 24, tripeptydylo-peptydazy 1).

Analizy proteomiczne wykonano podczas stażu naukowego w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytecie Południowej Danii w Odense. Uzyskane wyniki badań zaprezentowano podczas ustnej prezentacji (w języku angielskim) na międzynarodowej konferencji podczas XXVI Kongresu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. Publikacja pt.: „Urinary proteome of newborn calves” jest w trakcie przygotowywania do opublikowania w czasopiśmie PlosOne.

Wykorzystując elektroforezę jednokierunkową w połączeniu z techniką Western blott obserwowano istotny wzrost ekspresji akwaporyny 2 w moczu tygodniowych, dwutygodniowych i trzytygodniowych cieląt poddanych działaniu nadmiernej podaży laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym. Ponadto sugerowano, że na wykazane zmiany wydalania tego białka z moczem nie miała wpływu wazopresyna argininowa, której stężenie w osoczu krwi nie zmieniało się po podaniu laktozy. Nie obserwowano również zmian w ciśnieniu osmotycznym osocza krwi cieląt.

Krew, docierając do wszystkich komórek organizmu, staje się rezerwuarem białek oraz metabolitów wydzielanych przez tkanki ustroju. Techniki proteomiczne są powszechnie stosowane podczas analiz składu białkowego osocza (surowicy) krwi. Duża zawartość soli oraz duża dysproporcja pomiędzy białkami występującymi w niewielkiej ilości a występującymi w nadmiarze są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za trudności w pełnej charakterystyce proteomu osocza (surowicy) krwi. Dostępne są różne metody usuwania białek występujących w nadmiarze w osoczu krwi lub surowicy. Jedną z najbardziej obecnie skutecznych metod jest technika oparta na kombinatorycznych bibliotekach ligandów heksapeptydowych. Zastosowanie tej techniki w omawianej pracy badawczej zwiększyło liczbę zidentyfikowanych spotów białkowych surowicy prosiąt oraz osocza krwi cieląt. Obserwowano, że relatywna ekspresja wybranych spotów białek występujących w niewielkiej ilości zwiększyła się po zmniejszeniu stężenia białek występujących w nadmiarze. Wykazano również zmniejszenie się formowania skupisk spotów białkowych. Wskazywano, że zastosowana metoda usuwania białek występujących w nadmiarze, jest powtarzalna i że można ją wykorzystać do przygotowywania prób osocza (surowicy) krwi młodych, rosnących zwierząt do elektroforezy 2D. Sugerowano, że zwiększanie ilości białek występujących w niewielkiej ilości na żelach 2D pozwala na kompletną analizę proteomu osocza (surowicy) krwi i tym samym umożliwia odkrycie nowych biomarkerów, które mogą być przydatne w medycynie weterynaryjnej.

Ciągle udoskonalanie elektroforetycznych metod rozdziału białek wymusiło konieczność poszukiwania bardziej czułych i mniej czasochłonnych metod ich wizualizacji. Na podstawie wyników badań różnych autorów trudno jest jednoznacznie określić skuteczność danego protokołu barwienia. Zastosowanie analizy porównawczej metod barwienia z użyciem błękitu coomassie G-250 wykazało, wyższą skuteczność detekcji białek z wykorzystaniem protokołu Pinka. Wykazano również, że metoda ta jest mniej czasochłonna od protokołu opracowanego przez Hovinga, a także nie wymaga zastosowania obciążającego środowisko metanolu.

Proteomika jest dziedziną nauki, która zajmuje się analizą proteomu, czyli całkowitego składu białkowego organizmu, a w szczególności strukturą i funkcją białek oraz ich wzajemnej interakcji. Badania z wykorzystaniem narzędzi proteomicznych prowadzone na zwierzętach hodowlanych, w tym na świnich, są skierowane na zrozumienie mechanizmów biologicznych, związanych z produkcją żywności na potrzeby człowieka. Dla współczesnej praktyki w przemyśle hodowlanym bardzo ważne znaczenie ma rozpoznanie chorób we wczesnym stadium. Dlatego, identyfikacja białek różniących się ekspresją może stanowić podstawę wyboru biomarkerów zarówno w diagnostyce, jak i działaniach prewencyjnych. Narzędzia proteomiczne znalazły zastosowanie w badaniach: jakości produktów zwierzęcych, nad optymalizacją reprodukcji. W omawianych pracach przeglądowych oraz podczas konferencji naukowych przedstawiono publikacje, w których wykorzystano techniki proteomiczne w badaniach na zwierzętach. Podkreślano, że w naukach przyrodniczych, jak również w rolnictwie, wdrożenie proteomiki jest ważnym krokiem w kierunku osiągnięcia lepszej jakości produktów i bardziej zrównoważonej produkcji zwierzęcej.

### Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje 58 pozycji (12 pozycji opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, 46 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora). Wyniki prowadzonych badań były prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Tabelaryczne zestawienie osiągnięć w pracy naukowo-badawczej

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
<b>1. Oryginalne opublikowane prace twórcze</b>	<b>2</b>	<b>22</b>	<b>24</b>
<b>a. w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)</b>		<b>13</b>	<b>13</b>
Acta Veterinaria Brno		1	1
Folia Biologica (Krakow)		4	4
Polish Journal of Veterinary Sciences		2	2
Biotechnic and Histochemistry		1	1
Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences		3	3
Canadian Journal of Animal Science		1	1
Journal of Physiology and Pharmacology		1	1
<b>b. w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>		<b>6</b>	<b>6</b>
Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series Veterinary Medicine		1	1
Acta Scientiarum Polonorum. Seria Medicina Veterinaria		1	1
Acta Scientiarum Polonorum. Seria Zootechnica		4	4
<b>c. w recenzowanych czasopismach, zeszytach lokalnych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica (obecnie: Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica)	2	3	5
<b>2. Inne publikacje</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>31</b>
a. doniesienia i komunikaty	7	13	20
b. prace przeglądowe	1	4	5
c. prace popularno – naukowe	2		2
d. rozdziały w monografiach		4	4
<b>3. Podręczniki i skrypty</b>		<b>2</b>	<b>2</b>
<b>4. Prace recenzowane nieopublikowane</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
a. w czasopismach z Impact Factor		1	1
<b>Razem</b>	<b>12</b>	<b>46</b>	<b>58</b>

Summaryczny *impact factor* (IF) za publikacje naukowe wg listy Journal Citation Reports (JRC) zgodnie z rokiem opublikowania – 8,108

Ogólna liczba punktów za publikacje naukowe wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania – 331


Liczba cytowań wg Web of Science – 23

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science – 3

#### **6. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach**

- „*Wpływ konwertazy angiotensyny i przedsiolkowego peptydu natriuretycznego na pourodzeniową adaptację nerek cieląt*”, 2002–2004, Komitet Badań Naukowych, nr 3P06D 028 22 (drugi wykonawca projektu).
- „*Wpływ nadmiaru węglowodanów w diecie na profil białkowy osocza krwi i moczu oraz nerkowe mechanizmy regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt w pierwszym miesiącu życia*”, 2010–2013, Narodowe Centrum Nauki, N N311 016239 (kierownik grantu).
- „*Analiza proteomu osocza krwi dojrzałych płciowo jałówek, pierwiastek w kolejnych miesiącach ciąży i krów w pierwszych trzech miesiącach laktacji*”, 2010–2013, Narodowe Centrum Nauki, N N311 012538 (wykonawca).

Szczecin, dnia 19 października 2015 roku

  
-----