

dr inż. Katarzyna Michałek

AUTOREFERAT

dotyczący działalności naukowo – badawczej

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

2016

1. Dane personalne:

Imię i nazwisko: **Katarzyna Michałek**

Imię i nazwisko panieńskie: **Katarzyna Sareło**

Miejsce pracy: **Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki**
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Doktora Judyma 6,
71-466 Szczecin

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

2001 r. stopień magistra nauk rolniczych w zakresie zootechniki (specjalność: fizjologia zwierząt) Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt; praca magisterska nt. „*Wybrane wskaźniki czynności nerek u ciężarnych kóz*”, promotor: *dr hab. Dorota Jankowiak prof. nadzw.*

2006 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. „*Wybrane wskaźniki czynności nerek u kóz w ciąży pojedynczej i bliźniaczej*”, promotor: *dr hab. Dorota Jankowiak prof. nadzw.*

2006 – 2008 r. *Przerwa w pracy naukowo - dydaktycznej związana z porodem bliźniaczym i opieką nad dziećmi.*

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

15.02.2008 – 14.12.2008 r. Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie (obecnie: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny)
stanowisko: adiunkt w wymiarze ½ etatu.

15.12.2008 r. – obecnie. Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie (obecnie: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny)
stanowisko: adiunkt w wymiarze 1/1 etatu.

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

A. Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl oryginalnych prac twórczych pt.:

„Akwaporyna 2 (AQP2): Identyfikacja oraz analiza udziału w nerkowej regulacji bilansu wodnego u bydła domowego (*Bos taurus*), dzika (*Sus scrofa*) i świń domowych (*Sus scrofa f. domestica*)”

w skład, którego wchodzi następujące publikacje:

1. **Michalek K**, Laszczyńska M, Ciechanowicz AK, Herosimczyk A, Rotter I, Oganowska M, Lepczyński A, Dratwa-Chałupnik A. Immunohistochemical identification of aquaporin 2 in the kidneys of young beef cattle. *Biotech. Histochem.* 2014, 89: 342-347.
IF: 1,444; Punkty MNiSW: 15; Indywidualny wkład: 60%
(Indywidualny wkład obejmował opracowanie metodyki i koncepcji badań, zebranie i przygotowanie materiału biologicznego, analizę immunohistochemiczną lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach bydła, interpretację uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków oraz napisanie manuskryptu)
2. **Michalek K**, Dratwa-Chałupnik A, Ciechanowicz AK, Malinowski E. Aquaporin 2: Identification and analysis of expression in calves urine during their first month of life. *Can. J. Anim. Sci.* 2014, 94: 653-659.
IF: 1,081; Punkty MNiSW: 30; Indywidualny wkład: 70%
(Indywidualny wkład obejmował opracowanie metodyki i koncepcji badań, zebranie i przygotowanie materiału biologicznego, analizę ekspresji AQP2 w moczu cieląt metodą Western blot, pomiar ciśnienia osmotycznego w osoczu krwi oraz moczu, pomiar mocznika i kreatyniny w osoczu krwi, analizę statystyczną, interpretację oraz opracowanie graficzne uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków oraz napisanie manuskryptu)
3. **Michalek K**, Czerniawska - Piątkowska E, Grabowska M, Laszczyńska M. Immunohistochemical identification of aquaporin 2 in the kidneys of wild boars (*Sus scrofa*). *T. J. Biol.* 2015, 39: 692-697.

IF: 1,183; Punkty MNiSW: 20; Indywidualny wkład: 60%

(Indywidualny wkład obejmował opracowanie metodyki i koncepcji badań, przygotowanie materiału biologicznego do badań, udział w barwieniu metodą H&E i PAS, udział w identyfikacji oraz lokalizacji AQP2 metodą IHC, interpretację oraz opracowanie graficzne uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków oraz napisanie manuskryptu)

4. **Michałek K**, Grabowska M, Skowroński M, Lepczyński A, Herosimczyk A, Laszczyńska M. Effect of dietary supplementation with different levels of inulin-type fructans on renal expression of aquaporin2 (AQP2) of growing piglets. T. J. Vet. Anim. Sci., DOI:10.3906/vet-1507-16

IF: 0,352; Punkty MNiSW: 15; Indywidualny wkład: 60%

(Indywidualny wkład obejmował opracowanie metodyki i koncepcji badań, analizę lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach prosiąt metodą IHC, analizę ekspresji AQP2 w nerkach prosiąt metodą Western blot, analizę statystyczną, interpretację uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków oraz napisanie manuskryptu)

5. **Michałek K**, Kolasa – Wołosiuk A, Staśkiewicz Ł. Renal expression of aquaporin 2 (AQP2) of growing piglets fed diet supplemented with inulin and probiotics. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin. Agric. Aliment. Pisc. Zootech., 2016, DOI:10.21005/AAPZ2016.39.3.11

Punkty MNiSW: 10; Indywidualny wkład: 65%

(Indywidualny wkład obejmował opracowanie metodyki i koncepcji badań, udział w analizie lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach prosiąt metodą IHC, analizę ekspresji AQP2 w nerkach prosiąt metodą Western blot, analizę statystyczną, interpretację oraz opracowanie graficzne uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków oraz napisanie manuskryptu)

Łącznie - IF: 4,06; Punkty MNiSW: 90

Współczynnik Impact factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla pracy 4 wykazano IF za rok 2015;

Liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy; dla pracy 4 i 5 wykazano liczbę punktów MNiSW za rok 2015.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku nr 4.

B. Syntetyczne omówienie rozprawy habilitacyjnej

Wprowadzenie

Utrzymanie zrównoważonego bilansu wodnego i tym samym zachowanie właściwego ciśnienia osmotycznego zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz komórek jest niezbędnym czynnikiem warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych. Kluczowym elementem tego fundamentalnego procesu, leżącego u podstaw każdego życia jest transport wody przez błony komórkowe. Przemieszczanie się wody poprzez dwuwarstwową błonę lipidową zachodzi na drodze dyfuzji prostej oraz poprzez wyspecjalizowane kanały wodne, zwane akwaporynami (AQP). Dyfuzje prostą charakteryzuje niewielka szybkość i ograniczone natężenie, natomiast poprzez pojedynczy kanał akwaporyny transportowane jest blisko 2-3⁹ cząsteczek wody na sekundę (Zeidel i in. 1992, Agre i Konzo, 2012, Benga 2009). To właśnie akwaporyny - małe, transbłonowe białka stanowią główną drogę, którą pokonuje woda przemieszczając się z lub do komórki.

Akwaporyny należą do dużej rodziny integralnych, hydrofobowych białek o masie molekularnej od 27 kDa do 37 kDa. Od odkrycia pierwszej akwaporyny w błonach komórkowych erytrocytów przez Petera Agre i współpracowników uhonorowanego nagrodą Nobla w 2003 roku, do dziś zidentyfikowano ponad 300 różnych akwaporyn, a ich obecność potwierdzono właściwie we wszystkich badanych organizmach. Akwaporyny zidentyfikowano u bakterii, drożdży, roślin, pierwotniaków, owadów, płazów, ptaków i ssaków (Tanaka i in. 2005, Benga 2009). U ssaków zidentyfikowano 13 izoform tego białka (AQP0-AQP12), zlokalizowanych w wielu typu komórek (Holmes 2012). Akwaporyny obejmują trzy grupy: (1) akwaporyny klasyczne, które przepuszczalne są tylko dla cząsteczek wody (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5), (2) akwagliceroporyny, przepuszczalne również dla innych małych cząsteczek tj. glicerol, mocznik i amoniak (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10) i (3) tzw. "unorthodoxaquaporins" – akwaporyny nietypowe (AQP6, AQP8, AQP11 and AQP12), które wykazują niską homologię do innych białek z tej rodziny (Rojek 2008, Holmes 2012, Park i Kwon 2015).

W nerkach, które jak ogólnie wiadomo są głównym narządem regulującym gospodarkę wodno-elektrolitową oraz kwasowo-zasadową zlokalizowanych jest dziewięć izoform akwaporyn. W komórkach nabłonka poszczególnych odcinków kanalików nerkowych zlokalizowane są AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8 i AQP11 (Procino i in. 2011, Holmes 2012, Kortenoeven i Fenton 2014).

Szczególną rolę w nerkowej regulacji wydalania wody w odniesieniu do aktualnych potrzeb organizmu odgrywa AQP2. Białko to, zlokalizowane w komórkach głównych kanalików łączących (CNT, connecting tubules) i kanalików zbiorczych (CD, collecting duct), w odpowiedzi na wzrost molalności osocza krwi powoduje zwiększone zatrzymywanie wody w nerkach i tym samym wydalanie małych objętości zagęszczonego moczu (Sasaki 2012). Resorpcja wody poprzez AQP2 w końcowym odcinku kanalika nerkowego ma ogromne znaczenie w utrzymaniu właściwego bilansu wodnego, a wszelkie zaburzenia w przebiegu tego procesu prowadzić mogą do licznych chorób (Sasaki 2012). Dlatego też w ostatnich latach obserwuje się ogromne zainteresowanie tym białkiem, zwłaszcza w kontekście zaburzeń gospodarki wodno- elektrolitowej. Do tej pory przeprowadzono szereg badań dotyczących zarówno lokalizacji AQP2 jak i czynników regulujących ekspresję tego białka m.in. u myszy, szczurów, królików, owiec i ludzi. Niestety nie wiele jest danych z tego zakresu u bydła, zwierząt wolnożyjących i świń. Właściwie u tych gatunków zwierząt ani nie określono precyzyjnie lokalizacji AQP2 w nerkach ani nie podjęto próby oceny zarówno udziału tego białka w nerkowym zatrzymywaniu wody jak i czynników mogących wpływać na jego ekspresję. Wobec tego oraz mając na uwadze, że rozwój i postęp wiedzy w zakresie fizjologii zwierząt hodowlanych przyczyniają się do lepszego zrozumienia ich potrzeb, stworzenia jak najlepszych warunków do prawidłowego wzrostu, rozwoju i ich utrzymania, co następnie przekłada się na wzrost efektywności produkcji zwierzęcej podjęto się badań, których głównym celem była identyfikacja, lokalizacja oraz ocena udziału AQP2 w nerkowej regulacji bilansu wodnego u bydła, dzika oraz świń domowych. W efekcie przeprowadzonych badań, uzyskane wyniki oraz stwierdzenia i wnioski opublikowano w cyklu jednotematycznych oryginalnych prac twórczych, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

-
- Agre P i Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases, *FEBS Lett.* 2012, 555: 72–78.
Benga G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future, *IUMB Life* 2009, 61: 112-133.
Holmes RP. The role of renal water channels in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 2012, 33: 547-552.
Kortenoeven LA i Fenton RA. Renal aquaporins and water balance disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, 1840: 1533-1549.
Park EJ i Kwon TH. A minireview on vasopressin-regulated aquaporin-2 in kidney collecting duct cells. *E & BP* 2015, 13: 1-6.
Procino G i in. AQP5 is expressed in type-B intercalated cells in the collecting duct system of the rat, mouse and human kidney. *Cell Physiol. Biochem.* 2011, 28: 683-692.
Rojek A i in. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol.* 2008, 70: 301-327, 2008.
Sasaki S. Aquaporin 2: From discovery to molecular structure and medical implications. *Mol. Aspects Med.* 2012, 33: 535-546.
Tanaka S i in. Immunocytochemical and phylogenetic distribution of aquaporins in the frog ventral skin and urinary bladder. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005, 1040: 483-485.
Zeidel ML i in. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 1992, 31: 7436-7440.

Omówienie publikacji stanowiących podstawy do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego

Publikacja nr 1. Michałek K, Laszczyńska M, Ciechanowicz AK, Herosimczyk A, Rotter I, Oganowska M, Lepczyński A, Dratwa-Chałupnik A. Immunohistochemical identification of aquaporin 2 in the kidneys of young beef cattle. *Biotech. Histochem.* 2014, 89: 342-347.

Mając na uwadze różnice w budowie nerek bydła w porównaniu do innych zwierząt oraz wobec braku pełnych informacji na temat AQP2 u tego gatunku zwierząt w pracy tej podjęto się identyfikacji oraz szczegółowej lokalizacji tego białka. Badania przeprowadzono na nerkach pochodzących od sześciu 7 miesięcznych cieląt rasy polsko - fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Nerki pozyskano z lokalnej rzeźni. Bezpośrednio po uboju nerki pobrano, wypreparowano fragmenty, które następnie utrwalono w zbuforowanej formalinie, zatopiono w bloczkach parafinowych i pocięto na skrawki o grubości 2 μm . W celu oceny morfologicznej oraz histochemicznej preparaty wybarwiono hematoksyliną i eozyną (H&E) oraz kwasem nadjodowym wg Schiffa (PAS). Analizę immunohistochemiczną przeprowadzono z zastosowaniem przeciwciał pierwszorzędowych anti - AQP2 H7661 (Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark) rozcieńczonych w stosunku 1:900 i przeciwciał drugorzędowych związanych z peroksydazą chrzanową (P 0448; Dako, Glostrup, Denmark). Reakcje antygen – przeciwciało wizualizowano 10 min. z zastosowaniem 0,05% 3,3'- diaminobenzydyny (Kem-en-Tek, Copenhagen, Denmark) rozpuszczonej w wodzie destylowanej z 0,1% H_2O_2 .

W efekcie przeprowadzonych badań potwierdzono obecność AQP2 w komórkach głównych kanalików zbiorczych nerek u 7 miesięcznych cieląt rasy polsko - fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Na skrawkach poprzecznych nerek stwierdzono immunolokalizację AQP2 tylko w komórkach nabłonka sześciennego kanalików zbiorczych w promieniach rdzennych kory oraz warstwie rdzennej nerek cieląt. Silną immunoreakcję zaobserwowano szczególnie w błonie szczytowej komórek kanalików zbiorczych. Ogólnie wiadomo, że głównym czynnikiem powodującym wzrost ekspresji AQP2 w błonie szczytowej komórek kanalików zbiorczych, jest wazopresyna (AVP) uwalniania z nerwowej części przysadki pod wpływem wzrostu ciśnienia osmotycznego osocza krwi (Sasaki 2012, Takata i in. 2008). Przy braku stymulacji wazopresyną, AQP2 zlokalizowana jest głównie w endosomalnych pęcherzykach sieci trans aparatu Golgiego (Moeller i in. 2009). Po związaniu się AVP z receptorem V_2R dochodzi do aktywacji podjednostki alfa białka G_s i wzrostu aktywności cykazy adenylowej. W efekcie wzrasta produkcja cAMP,

który następnie zwiększa aktywność kinazy białkowej A (PKA). Aktywna forma PKA fosforyluje serynę w pozycji Ser256 (AQP2pS256), zlokalizowaną na cytoplazmatycznym C-końcu monomeru AQP2. Jak podają Hoffert i in. (2008) fosforylacja co najmniej trzech monomerów AQP2 jest niezbędna do rozpoczęcia przemieszczenia się AQP2 z pęcherzyków, a następnie wzrostu ekspresji tego białka w błonie szczytowej komórek kanalików zbiorczych. Badania u zwierząt laboratoryjnych wykazały, że fosforylacja seryny zachodzi również w pozycjach Ser261 (AQP2pS261), Ser264 (AQP2pS264) i Ser269 (AQP2pS269) (Fenton i in. 2008, Hoffert i in. 2008). W odpowiedzi na wazopresynę wzrasta poziom fosforylowanej seryny w pozycji 256, 264 i 269. Natomiast przy braku stymulacji AVP wzrasta poziom fosforylowanej Ser261 (Moeller i Fenton 2012). Rola fosforylacji w wymienionych pozycjach nie jest do końca wyjaśniona. Wykazano jednak, że fosforylacja Ser256 jest niezbędna do rozpoczęcia transportu i fuzji AQP2 z szczytową błoną komórek. Stwierdzono również, że poszczególne izoformy AQP2 są zlokalizowane w różnych wewnątrzkomórkowych organellach. Jak podaje Moeller i in. (2009) AQP2 ufosforylowana w pozycji Ser269 obserwowana była tylko w błonie szczytowej. AQP2pS256 stwierdzono zarówno w błonie szczytowej, jak i wewnątrzkomórkowych pęcherzykach. Ufosforylowana Ser261 obserwowano głównie w wewnątrzkomórkowych komponentach aparatu Golgiego i w lizosomach. AQP2 ufosforylowana w pozycji S264 zlokalizowana jest zarówno w szczytowej jak i podstawnej błonie komórkowej (Christensen i in. 2000, Fenton i in. 2008, Hoffert i in. 2008, Moeller i Fenton 2012, Takata i in 2008). W prezentowanych badaniach do analizy immunocytochemicznej AQP2 w nerkach cieląt wykorzystano przeciwciała anti - total AQP2, zatem nie jest możliwa ocena lokalizacji w określonych strukturach poszczególnych izoform AQP2. Można jednak przypuszczać na podstawie zacytowanej powyżej literatury, że obserwowana silna ekspresja w błonie szczytowej komórek kanalików zbiorczych nerek cieląt to AQP2p256, AQP2pS264 i AQP2pS269.

Przy braku stymulacji wazopresyną AQP2 zlokalizowana jest głównie w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach komórek nabłonka kanalików zbiorczych. W analizowanych preparatach nerek cieląt stwierdzono słabą ekspresję AQP2 również w licznych wewnątrzkomórkowych komponentach. Obserwowana immunorekcja najprawdopodobniej związana była z obecnością w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach głównie AQP2pS256 i AQP2pS261.

Nielsen i in. (1993) w swoich badaniach nad lokalizacją oraz ekspresją AQP2 w nerkach szczurów stwierdzili, że niewielka ilość tego białka występuje również w błonie podstawnej komórek kanalików zbiorczych, szczególnie w wewnętrznej warstwie rdzenia. Podobne wyniki uzyskano w prezentowanym doświadczeniu. W skrawkach poprzecznych rdzenia nerek cieląt obserwowano słabą, ale dość wyraźną ekspresję tego białka w błonach podstawnych komórek głównych kanalików zbiorczych.

Obserwowana lokalizacja, dystrybucja i ekspresja AQP2 u badanych cieląt była typowa i charakterystyczna dla ludzi i innych gatunków zwierząt (Nielsen i in. 1993, Kishore i in. 1996, Loffing i in. 2000, Bauchet i in. 2011). Jedynie obserwowana ekspresja AQP2 w błonie podstawnej, wydaje się być większa w nerkach bydła niż u ludzi i zwierząt laboratoryjnych. Silniejsze wybarwienie AQP2 w błonie podstawnej, wskazywać może na znacznie większy u tego gatunku zwierząt udział AQP2 w transporcie wody z komórek głównych do przestrzeni okołokanalikowej. Te przypuszczenia wydają się potwierdzać wyniki badań przeprowadzonych przez Altunbas i in. (2013). Zarówno u ludzi jak i zwierząt laboratoryjnych w błonach podstawnych komórek głównych kanalików zbiorczych zlokalizowane są AQP3 i AQP4. To przez nie wypływa woda, która poprzez AQP2 dostaje się do komórek. Altunbas i in. (2013) zidentyfikowali AQP4 tylko w cytoplazmie komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego. W celu utrzymania efektywnego transportu wody ze światła kanalika poprzez komórki nabłonka, brak AQP4 w błonie podstawnej musi być, zatem zrekompensowany przez inną AQP. Ponieważ w błonach podstawnych komórek głównych kanalików zbiorczych stwierdzono dość wyraźną ekspresję AQP2, wysunięto koncepcję, że być może to białko w nerkach cieląt spełnia rolę AQP4.

Publikacja nr 2. Michałek K, Dratwa-Chałupnik A, Ciechanowicz AK, Malinowski E. Aquaporin 2: Identification and analysis of expression in calves urine during their first month of life. *Can. J. Anim. Sci.* 2014, 94: 653-659.

Jak wspomniano wcześniej po związaniu się AVP z receptorem V_2R dochodzi do transportu i fuzji AQP2 z błoną szczytową komórek głównych kanalików łączących i zbiorczych nerek. Po fuzji z błoną szczytową AQP2 jest wydzielana do moczu lub ulega endocytozie (Rojek et al. 2006, Fenton et al. 2008, Moeller i Fenton 2012). Badania nerkowego wydalania AQP2 u dorosłych szczurów wykazały, że od 3 do 6 % AQP2 w kanalikach nerkowych jest wydalana wraz z moczem. U dorosłych ludzi i szczurów nerkowe wydalanie AQP2 pozytywnie koreluje ze zmianami koncentracji wazopresyny w osoczu krwi (Takata i in. 2008). Na podstawie tej zależności wysunięto koncepcję, że pomiar AQP2 w moczu może być czułym wskaźnikiem działania wazopresyny w nerkach oraz przydatnym parametrem w diagnozowaniu zaburzeń gospodarki wodnej (Sasaki 2012). Ogólnie wiadomo, że nerki noworodków w porównaniu z osobnikami dorosłymi mają ograniczone możliwości do produkcji zagęszczonego moczu. Czynnościowo niedojrzałe nerki niemowląt są zdolne do koncentracji moczu maksymalnie do 600-800 mmol/kg H_2O , co stanowi zaledwie połowę wartości osiągniętych przez osobniki dorosłe (Tasukahara et al. 1998).

Ograniczona zdolność nerek do zatrzymywania wody w okresie neonatalnym związana jest m.in. ze zmniejszoną zdolnością niedojrzałych nerek do utrzymania wysokiego gradientu osmotycznego. Z badań przeprowadzonych u noworodków szczurów oraz ludzi stwierdzono również obniżoną odpowiedzi kanalików nerkowych na stymulację AVP przy udziale AQP2. Mechanizm tego procesu nie jest jednak w pełni wyjaśniony (Bonilla-Fenix 2004).

Cielęta podobnie jak noworodki innych gatunków zwierząt posiadają nerki, które nie są w pełni dojrzałe zarówno morfologicznie jak i czynnościowo. Cechuje je m.in. obniżona wielkość przepływu krwi z jednoczesnym przesunięciem nerkowego rozdziału krwi w kierunku rdzenia, obniżona filtracja kłębkowa (GFR, glomerular filtration rate), obniżona wydolność sekrecyjno-resorpcyjna kanalików nerkowych a także zmniejszona zdolność do produkcji zagęszczonego moczu (Dratwa 2006). Ograniczona zdolność nerek cieląt do produkcji zagęszczonego moczu może być związana ze zmniejszoną resorpcją wody w kanalikach nerkowych poprzez AQP2. W literaturze brak jest jednak jakichkolwiek danych na ten temat nie tylko u cieląt, ale także u innych gatunków zwierząt gospodarskich. W związku z istotnym znaczeniem AQP2 w nerkowym wydalaniu wody oraz możliwością wykorzystania pomiaru AQP2 w moczu w diagnozowaniu i monitorowaniu zaburzeń bilansu wodnego w prezentowanej pracy podjęto się badań, których celem była identyfikacja oraz analiza ekspresji AQP2 w moczu cieląt. W celu określenia zmian nerkowego wydalania AQP2 oraz roli tego białka w nerkowej regulacji bilansu wodnego w okresie neonatalnym, u cieląt wywołano krótką, kontrolowaną biegunkę.

W efekcie przeprowadzonych badań w moczu cieląt z zastosowaniem techniki Western blot zidentyfikowano dwie, charakterystyczne również dla ludzi i zwierząt laboratoryjnych formy AQP2. Formę nie glikolizowaną o masie cząsteczkowej około 29 kDa oraz formę glikolizowaną o masie cząsteczkowej od 35 do 45 kDa. Jak dotąd przedstawione w pracy wyniki, to jedyne dane literaturowe, dotyczące nerkowego wydalania AQP2 u bydła. W prezentowanym doświadczeniu stwierdzono, że u cieląt w odpowiedzi na dodatkowe straty wody wraz z kałem podczas biegunki, wzrasta blisko trzykrotnie ekspresja AQP2 w moczu. Niewątpliwy wzrost ekspresji AQP2 w błonie szczytowej komórek głównych, czego efektem był obserwowany wzrost nerkowego wydalania tego białka wraz z moczem, nie wydawał się jednak powodować zwiększonego zatrzymywania wody w kanalikach nerkowych, o czym świadczył brak zmian ciśnienia osmotycznego moczu cieląt. Brak zmian molalności oraz zwiększoną ekspresję AQP2 w moczu obserwowano również u noworodków ludzkich (Zelenina i in. 2006). Brak zależności pomiędzy wzrostem ekspresji AQP2 i osmolalnością moczu obserwowaną u badanych cieląt, najprawdopodobniej było efektem niedojrzalej struktury morfologicznej nerek i ograniczoną ich zdolnością do produkcji

wysokiego gradientu osmotycznego (Holdbäck i Aperia 2003). Niemniej jednak uzyskane wyniki, wskazują iż u bydła już w pierwszych tygodniach życia funkcjonuje sprawny mechanizm, prowadzący do zwiększenia nerkowej ekspresji AQP2 w odpowiedzi na dodatkowe straty wody. Mechanizm ten do dziś nie jest u tego gatunku zwierząt w pełni wyjaśniony, a wydaje się być on nieco odmienny niż u ludzi i zwierząt laboratoryjnych. U cieląt, bowiem stwierdzono związek pomiędzy zmianą osoczowej koncentracji Ca^{2+} a zmianami nerkowego wydalania AQP2. Jak wspomniano wcześniej u ludzi i zwierząt laboratoryjnych głównym czynnikiem powodującym zwiększenie ekspresji AQP2 w błonie szczytowej i zwiększenie wydalania tego białka wraz z moczem jest AVP. U cieląt w czasie krótkotrwałej biegunki obserwowano wzrost nerkowego wydalania AQP2, jednak przy braku zmian osmolalności osocza krwi oraz koncentracji AVP. Stwierdzono natomiast istotne obniżenie osoczowego poziomu Ca^{2+} . W literaturze znane są prace, w których autorzy również obserwowali związek pomiędzy zmianami koncentracji w osoczu krwi Ca^{2+} a ekspresją AQP2 w nerkach (Sands i in. 1998, Valenti i in. 2000, Németh-Cahalan i in. 2004). W doświadczeniu na szczurach wykazano m.in., że wzrost osoczowego poziomu wapnia powoduje zmniejszenie o blisko 50% ogólnej ilości AQP2 w kanalikach nerkowych, zmniejszenie ekspresji AQP2 w błonie szczytowej komórek głównych oraz zmniejszenie wydzielania tego białka wraz z moczem (Earm i in. 1998). Jak podają niektórzy autorzy, zwiększony poziom Ca^{2+} w osoczu krwi mógł zmniejszyć stymulowaną AVP aktywację cyklazy adenylowej zmniejszenie produkcji cAMP. Wobec tego wysunięto koncepcję, że obserwowane zmniejszenie poziomu Ca^{2+} w osoczu krwi cieląt (najprawdopodobniej spowodowane przyspieszonym pasażem treści jelitowej i zmniejszoną absorpcją wapnia w jelicie cienkim podczas biegunki) mogło przyczynić się do zniesienia hamującego działania podwyższonego poziomu wapnia na wzrost ekspresji AQP2 w błonie szczytowej komórek głównych kanalików zbiorczych i tym samym przyczynić się do zwiększenia nerkowego wydalania tego białka.

Publikacja nr 3. Michałek K, Czerniawska - Piątkowska E, Grabowska M, Laszczyńska M. Immunohistochemical identification of aquaporin 2 in the kidneys of wild boars (*Sus scrofa*). T. J. Biol. 2015, 39: 692-697.

Sus scrofa to gatunek dużego, lądowego ssaka z rzędu parzystokopytnych (*Artiodactyla*). W Europie to jedyny gatunek świniowatych żyjący na wolności. Obecny naturalny zasięg dzików to przede wszystkim obszary północnej części Afryki oraz środkowej i południowej Eurazji. Dzikie to zwierzęta wszystkożerne, których pokarm powyżej 90% jest pochodzenia roślinnego i około 10% pochodzenia

zwierzęcego (Pilaryczyk i in. 2010). Świniowate posiadają nerki wielopłatowe (wielobrodawkowe) ale bez zewnętrznych bruzd typowych dla bydła. Niektóre piramidy występują pojedynczo a niektóre pierwotnie rozdzielone ulegają fuzji. Szczyty piramid, zwane brodawkami uchodzą do miedniczek nerkowych albo ich rozwidleń. Brodawki pojedynczych piramid są wąskie i stożkowe, natomiast tych, które uległy fuzji często są szerokie. U świniowatych jest około 8 - 12 brodawek. Nerki świń zawierają ponad 1 milion nefronów. Kanaliki zbiorcze uchodzą u szczytu brodawek nerkowych (Drolet 2006). Ilość dobowej produkcji moczu u *Sus Scrofa* zależy od wielu czynników, wśród których należy wymienić dietę, pobór wody, temperaturę i wilgotność otoczenia, rozmiar oraz wagę zwierzęcia. Średni ciężar właściwy moczu u dorosłych świń wynosi około 1,020 i jest jednym z najniższych w porównaniu do innych gatunków zwierząt (Ruckebusch i in. 1991). Natomiast maksymalna zdolność do zagęszczania moczu wynosi około 1.1 osmol/l (Ketz 1960).

Wobec tego, że do tej pory nie podjęto się żadnych badań w zakresie udziału w nerkowym zatrzymywaniu wody AQP2 u zwierząt wolnożyjących, w omawianej pracy zaprezentowano wyniki badań, których celem była identyfikacja oraz analiza ekspresji AQP2 w nerkach dzika (*Sus scrofa*). W pracy tej wykorzystano metody i protokoły, które wcześniej opracowano i optymalizowano podczas badań AQP2 w nerkach cieląt. Badania przeprowadzono na 6 nerkach pochodzących od 2 - 3 letnich dzików żyjących w zachodnio-północnej części Polski. Dzikie ustrzelono podczas sezonu polowań 2013 - 2014 roku. Bezpośrednio po śmierci nerki wypreparowano, utrwalono w zbuforowanej formalinie, zatopiono w bloczki parafinowe i pokrojono na skrawki o grubości 2 μ m. Wykonano barwienie H&E i PAS. Analizę immunohistochemiczną dokonano z zastosowaniem przeciwciał pierwszorzędowych anti - AQP2 H7661 (Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark) rozcieńczonych w stosunku 1:900 i przeciwciał drugorzędowych związanych z peroksydazą chrzanową (Dako REAL EnVision detection system peroxidase/DAB+ rabbit/mouse, Dako, Denmark).

Na podstawie uzyskanych wyników jednoznacznie potwierdzono obecność AQP2 w komórkach głównych kanalików zbiorczych nerek dzika. Na przekrojach poprzecznych nerek zlokalizowano AQP2 tylko w komórkach głównych kanalików zbiorczych w promieniach rdzennych kory oraz w rdzeniu. Silną immunoreakcję obserwowano w szczytowej błonie komórek kanalików zbiorczych. Natomiast słabszą ekspresję AQP2 stwierdzono w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach i błonie podstawnej. W związku z tym, że podobnie jak w publikacji nr 1 wykorzystano przeciwciała anti - total AQP2 zaproponowano podobny jak u cieląt i innych gatunków zwierząt schemat rozmieszczenia poszczególnych izoform tego białka. Przypuszczalnie w szczytowej błonie komórek głównych zlokalizowane są AQP2p256, AQP2pS264 AQP2pS269. Natomiast w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach AQP2pS256 i AQP2pS261. Uzyskane

w prezentowanej pracy wyniki jednoznacznie wskazują, że również u tego gatunku zwierząt AQP2 odgrywa istotną rolę nie tylko w transporcie wody ze światła kanalika do komórki ale także z komórki do otaczającej tkanki śródmiąższowej. Aby jednak w pełni wyjaśnić udział AQP2 w regulacji bilansu wodnego u *Sus scrofa* niezbędne jest wykonanie kolejnych bardziej szczegółowych analiz. Niestety ze względu na dziki i wolnożyjący tryb życia tych zwierząt, prowadzenie tego typu badań jest znacznie utrudnione.

Publikacja nr 4. Michałek K, Grabowska M, Skowroński M, Lepczyński A, Herosimczyk A, Laszczyńska M. Effect of dietary supplementation with different levels of inulin-type fructans on renal expression of aquaporin2 (AQP2) of growing piglets. T. J. Vet. Anim. Sci. DOI:10.3906/vet-1507-16.

Wobec tego, że we wcześniejszej pracy w nerkach świniowatych potwierdzono obecność oraz szczegółowo opisano lokalizację i ekspresję AQP2 postanowiono kontynuować badania w tym zakresie u tej grupy zwierząt. W związku ze wzrastającym zainteresowaniem stosowania w diecie dodatku fruktanów typu inulinowego zarówno u ludzi jak i zwierząt oraz braku w literaturze danych dotyczących wpływu tak suplementowanej diety na AQP2 podjęto się badań, których głównym celem była analiza zmian lokalizacji oraz ekspresji tego białka w nerkach rosnących prosiąt żywionych dietą suplementowaną fruktanami typu inulinowego. Badania przeprowadzono na 40 samcach prosiątach krzyżówkach PIC x Penarlan P76. Od dziesiątego dnia życia prosięta podzielono na pięć grup żywieniowych (n=8). Prosięta z grupy kontrolnej były karmione *ad libitum* dietą standardową. Prosięta z grup I, II i III były żywione *ad libitum* dietą standardową zawierającą w swym składzie odpowiednio 1%, 2% i 3% dodatek fruktanów typu inulinowego. Prosięta z grupy IV były żywione *ad libitum* dietą standardową z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii. W 50 dniu życia zwierzęta uśmiercono. Bezpośrednio po uboju pobrano nerki, wypreparowano fragmenty, które następnie zostały wykorzystane do analizy histologicznej, immunohistochemicznej oraz metodą Western blot. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono m.in., że u zwierząt żywionych dietą suplementowaną fruktanami typu inulinowego w porównaniu do grupy kontrolnej wzrasta ekspresja AQP2. Wzrost ekspresji tego białka widoczny jest szczególnie w grupie II, III i IV.

Jak wspomniano wcześniej głównym czynnikiem regulującym ekspresję AQP2 w nerkach jest AVP. Hormon ten reguluje przepuszczalność kanalików zbiorczych dla wody na drodze dwóch procesów. Pierwszy z nich to regulacja krótkotrwała. W odpowiedzi na stymulację AVP w ciągu kilku minut dochodzi do transportu i fuzji pęcherzyków zawierających AQP2 z błoną szczytową komórek głównych (opisany wcześniej proces AVP – AC – cAMP - PKA) (Wilson i in. 2013) . Drugi proces to regulacja długoterminowa

podczas której w odpowiedzi na AVP w ciągu od kilku godzin do kilku dni następuje wzrost ogólnej ilości AQP2 w nerkach. W procesie regulacji długotrwałej ogólna ilość AQP2 w kanalikach nerkowych jest efektem odpowiedniego balansu pomiędzy produkcją w procesie translacji a degradacją albo sekrecją AQP2 w pęcherzykach do moczu (Wilson i in. 2013).

W prezentowanym doświadczeniu, u prosiąt karmionych dietą zmodyfikowaną w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej stwierdzono wzrost ekspresji AQP2 w rdzeniu nerek. Obserwowany wzrost ogólnej ilości AQP2 wydają się być podobny do tego, który obserwuje się podczas regulacji długotrwałej. Tym razem jednak, czynnikiem wywołującym kaskadę procesów prowadzących w efekcie do prawdopodobnego zwiększenia translacji, ograniczenia degradacji i usuwania tego białka z komórek jest długotrwałe podawanie zwierzętom wraz z paszą fruktanów typu inulinowego. Przy zastosowaniu w diecie 2% i 3% udziału fruktanów typu inulinowego oraz suszu z cykorii ekspresja AQP2 określona metodą Western blot jest blisko trzykrotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza immunohistochemiczna wykazała, że wzrasta również ekspresja AQP2 w szczytowej błonie komórek głównych. W efekcie zwiększenia ekspresji AQP2 w błonach szczytowych oraz ogólnej ilości tego białka w rdzeniu nerek można wnioskować, iż u zwierząt karmionych dietą z wysoką zawartością fruktanów znacząco wzrasta nerkowa resorpcja wody. W jaki jednak sposób skarmianie zwierząt paszą z dodatkiem fruktanów typu inulinowego spowodowało obserwowane zmiany ekspresji i immunolokalizacji AQP2 trudno jednoznacznie wyjaśnić. Pomocne w wyjaśnieniu tego zjawiska mogą być wyniki badań opublikowanych przez Nasir i współpracowników (2008). Autorzy ci wykazali, że u zdrowych myszy pojonnych wodą z 10% dodatkiem gumy arabskiej (GA, gum arabic) m.in. wzrosła wielkość filtracji kłębkowej. Obserwowany u myszy wzrost GFR mógł być spowodowany zwiększoną ilością krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, short chain fatty acids) takich jak maślany, które są produktami degradacji GA przez jelitowe bakterie w okrężnicy. Jak wykazali, bowiem inni autorzy SCFA w tym maślany powodują wzrost GFR i przepływ krwi przez nerki (RBF, renal blood flow) (Fioretto i in. 1987, Bliss 2004). U badanych myszy po podaży 10% GA stwierdzono zmniejszenie nerkowego wydalania Na^+ i Cl^- oraz wzrost koncentracji tych elektrolitów w osoczu krwi. Nie stwierdzono jednak zmian stężenia aldosteronu (ALDO) i ciśnienia krwi. Stwierdzono natomiast istotną redukcję objętości wydalanego moczu pomimo stałego poboru wody oraz zwiększonego nerkowego wydalania AVP. Zwiększonemu wydalaniu wraz z moczem AVP niewątpliwie towarzyszyło zwiększenie ekspresji ogólnej ilości AQP2 w nerkach badanych myszy, czego efektem było obserwowane zmniejszenie diurezy. Wzrost nerkowego wydalania AVP i zmniejszenie objętości wydalanego moczu prawdopodobnie nastąpiło m.in. w odpowiedzi na wzrost osoczowej koncentracji Na^+

i Cl⁻. Zwiększenie wchłaniania wody w kanalikach nerkowych u myszy mogło być również rezultatem zwiększenia GFR. Wiadomo bowiem, że zwiększeniu GFR i tym samym zwiększeniu ładunku przesączonego wielu substancji, w tym także wody często towarzyszą nasilone procesy kanalikowej resorpcji.

Ogólnie wiadomo, że fruktany typu inulinowego w jelicie grubym ulegają selektywnej i szybkiej fermentacji bakteryjnej, przyczyniając się do wzrostu pałeczek kwasu mlekowego. W badaniach na dorosłych świniach i rosnących prosiątach wykazano, że dodatek inuliny w paszy przede wszystkim stymuluje wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (Lynch i in. 2007). W wyniku tzw. „efektu bifidogenego” (selektywnej fermentacji fruktanów przez *Bifidobacterium*), podobnie jak po podaży GA, u świń w jelicie krętym wzrasta produkcja SCFA, w tym także maślanów (Mair i in. 2010). Być może jednym z czynników, który mógł przyczynić się do obserwowanego wzrostu ekspresji AQP2 w rdzeniu nerek prosiąt żywionych paszą z dodatkiem fruktanów typu inulinowego, był właśnie wzrost produkcji maślanów i tym samym zwiększenie GFR. Najbardziej jednak prawdopodobną przyczyną wzrostu ogólnej ilości AQP2 i zwiększenia ekspresji tego białka w błonie szczytowej było zwiększone zapotrzebowanie na wodę w odpowiedzi na zwiększoną głównie w jelitach resorpcję wielu składników mineralnych. W wyniku wzrostu produkcji SCFA obniża się pH treści jelit. Niskie pH w jelitach zwiększa z kolei rozpuszczalność mikro- i makroelementów, podwyższa pulę składników zjonizowanych i tym samym ich wchłanianie. Ponadto SCFA mogą tworzyć kompleksy ze składnikami mineralnymi co również zwiększa ich resorpcję w jelitach. U świń skarmianych paszą z dodatkiem inuliny wzrasta jelitowe wchłanianie m.in. Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ (Yasuda i in. 2009, Jolliff i Mahan 2012, Untea i in. 2013). Zatem zwiększeniu koncentracji w osoczu krwi wielu składników mineralnych w wyniku ich zwiększonego wchłaniania w jelitach, w celu utrzymania bieżącego, właściwego bilansu wodno – elektrolitowego musi towarzyszyć zwiększenie resorpcji wody w kanalikach nerkowych. Prawdopodobnie u badanych świń, podobnie jak u myszy, którym podawano 10% GA i obserwowano wzrost nerkowego wydalania AVP, w odpowiedzi na zwiększoną koncentrację w osoczu krwi substancji mineralnych również doszło do zwiększonego wydzielania AVP. Rezultatem tego może być obserwowany u badanych prosiąt skarmianych paszą z dodatkiem fruktanów typu inulinowego wzrost ogólnej ilości AQP2 w rdzeniu nerek oraz zwiększenie ekspresji tego białka w szczytowej błonie komórek głównych kanalików zbiorczych. Zmiany te wydają się być proporcjonalne do wielkości dawki fruktanów typu inulinowego.

Publikacja nr 5. Michałek K, Kolasa – Wołosiuk A, Staśkiewicz Ł. Renal expression of aquaporin 2 (AQP2) of growing piglets fed diet supplemented with inulin and probiotics. *Folia Pomer Univ Technol Stetin Agric Aliment Pisc Zotech*, 2016, DOI:10.21005/AAPZ2016.39.3.11

Obserwowany w ostatnich latach ciągły wzrost zainteresowania stosowaniem naturalnych dodatków paszowych w żywieniu zwierząt (spowodowany głównie wprowadzonym przez Unię Europejską zakazem skarmiania zwierząt paszami z dodatkiem antybiotykowych stymulatorów wzrostu) skłonił do podjęcia kolejnych badań, których celem była również analiza lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach rosnących prosiąt żywionych paszą z dodatkiem probiotyku i wodno/alkoholowego roztworu inuliny z korzenia cykorii. Badania przeprowadzono na 16 samcach prosiątach krzyżówkach Danbred x Duroc. Od dziesiątego dnia życia prosięta podzielono na dwie grupy żywieniowe (n=8). Prosięta z grupy kontrolnej były karmione *ad libitum* dietą standardową. Prosięta z grupy eksperymentalnej żywione były *ad libitum* dietą standardową zawierającą w swym składzie 0,05% probiotyku (Łavipan) i 2% wodno/alkoholowego roztworu inuliny z korzenia cykorii. W 50 dniu życia zwierzęta uśmiercono. Bezpośrednio po uboju pobrano nerki, wypreparowano fragmenty, które następnie zostały wykorzystane do analizy histologicznej, immunohistochemicznej oraz metodą Western blot. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, że u zwierząt skarmianych dietą zmodyfikowaną ekspresja AQP2 wzrasta głównie w błonie szczytowej komórek głównych kanalików zbiorczych. Z zastosowaniem techniki Western blot wykazano również niewielki wzrost ekspresji ogólnej ilości AQP2 w rdzeniu nerek. Obserwowane zmiany w prezentowanym doświadczeniu najprawdopodobniej spowodowane były zaproponowanym w poprzedniej pracy (publikacja nr 4) zwiększonym zapotrzebowaniem na wodę niezbędną do utrzymania właściwego bilansu wodno-elektrolitowego, w odpowiedzi na zwiększone jelitowe wchłanianie wielu mikro- i makroelementów. Jak wspomniano bowiem wcześniej, inulina w jelicie grubym ulega fermentacji i przyczynia się do stymulacji wzrostu pałeczek kwasu mlekowego, głównie z rodzaju *Bifidobacterium*. Dodatkowo w prezentowanym doświadczeniu wraz z inuliną podawano jednocześnie probiotyk w skład, którego wchodziły również m.in. bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Zmiany mikroflory jelit wywołane podażą inuliny i probiotyku najprawdopodobniej spowodowały powstanie opisanego wyżej "efektu bifidogenego" i w konsekwencji wzrost produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Mair i in. 2010). Skutkiem zwiększonej produkcji SCFA jest zmniejszenie pH treści jelit. Niskie pH w jelitach nie tylko ogranicza rozwój patogennych bakterii ale również powoduje wspomniane zwiększenie rozpuszczalności mikro- i makroskładników, zwiększenie jonizacji i tym samym zwiększone ich wchłanianie w jelitach

(Untea i in. 2013). Niemniej jednak dodatek 0,05% probiotyku i 2% wodno/alkoholowego roztworu inuliny z korzenia cykorii nie wydają się powodować tak dużych zmian w ekspresji AQP2 w nerkach jak u prosiąt w doświadczeniu którym podawano dodatkowo fruktany typu inulinowego i susz z cykorii. W prezentowanej pracy, bowiem pomimo wzrostu ekspresji AQP2 w błonie szczytowej komórek głównych stwierdzono tylko niewielki wzrost ogólnej ilości tego białka w nerkach.

Podsumowanie publikacji stanowiących podstawy do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego

Upłynęło ponad 20 lat od momentu odkrycia w nerkach szczura AQP2 i zdefiniowania tego białka w procesie nerkowego zatrzymywania wody. Od tego momentu w rozpoczęto intensywne badania a w literaturze pojawiały się systematycznie prace, w których donoszono o nowych czynnikach wpływających na ekspresję AQP2, co pozwoliło m.in. na określenie udziału tego białka w rozwoju wielu chorób. Niestety większość tych badań prowadzona była u ludzi i zwierząt laboratoryjnych, a tylko nieliczne prace dotyczą tego zagadnienia u zwierząt gospodarskich. Pomimo obserwowanego w ostatnich latach ogromnego postępu wiedzy w zakresie udziału nerkowych akwaporyn w regulacji bilansu wodno-elektrolitowego, w tym AQP2, wciąż nie wiele jest wiadomo na ten temat u zwierząt hodowlanych i wolnożyjących. Wydaje się zatem, że opublikowane oryginalne prace twórcze stanowiące jednotematyczny cykl publikacji dotyczących identyfikacji i analizy ekspresji AQP2 w nerkach bydła, dzika i świń wychodzą na przeciw wyzwaniom nowoczesnej biologii i medycyny weterynaryjnej. Wśród najważniejszych osiągnięć tych prac niewątpliwie należy wymienić, szczegółowy opis lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach bydła, dzika i świń odzwierciedlający istotną rolę tego białka w nerkowym zatrzymywaniu wody również u tych gatunków zwierząt. Szczególnie interesujące jest stwierdzenie, że u bydła w odróżnieniu do ludzi i innych zwierząt jest silniejsza ekspresja AQP2 w błonie podstawnej komórek głównych kanalików zbiorczych nerek, co wskazują na znacznie większy udział tego białka w transporcie wody do przestrzeni okołokanalikowej. Należy również podkreślić, że po raz pierwszy dokonano identyfikacji i analizy ekspresji AQP2 w moczu cieląt, a do chwili obecnej są to jedyne dane z tego zakresu u bydła. Stwierdzono m.in., że u cieląt w pierwszych trzech tygodniach życia funkcjonuje sprawny mechanizm, prowadzący do zwiększenia nerkowej ekspresji AQP2 w odpowiedzi na dodatkowe straty wody. Mechanizm ten wydają się być nieco odmienny niż u ludzi i zwierząt laboratoryjnych. U cieląt, bowiem stwierdzono związek pomiędzy zmianą osoczowej koncentracji Ca^{2+} a zmianami nerkowego

wydalania AQP2. Wśród najważniejszych osiągnięć należy również wymienić dokonaną po raz pierwszy próbę oceny wpływu diety na zmiany lokalizacji i ekspresji AQP2 w nerkach świń. Stwierdzono m.in., że stosowanie w diecie dodatku 2 - 3% fruktanów typu inulinowego lub 4% suszu z cykorii powodują istotny wzrost ogólnej ilości AQP2 w rdzeniu nerek oraz zwiększenie ekspresji tego białka w szczytowej błonie komórek głównych kanalików zbiorczych. Obserwowane zmiany lokalizacji i ekspresji tego białka u świń żywionych tak zmodyfikowaną dietą, wydają się dodatkowo wspierać korzystny efekt stosowania fruktanów typu inulinowego w żywieniu zwierząt. W efekcie przeprowadzonych badań, wyniki zaprezentowane w jednotematycznym cyklu publikacji wnoszą nowe dane, które niewątpliwie przyczyniają się do wyjaśnienia fizjologicznej roli AQP2 w zakresie nerkowego zatrzymywania wody i tym samym głębszego zrozumienia czynności nerek u bydła, dzika i świń. Mam nadzieję, że te informacje staną się przyczynkiem, do dalszego rozwoju nauki w tym zakresie u zwierząt gospodarskich i wolożyjących, które dotychczas pomijane były w dyskusji naukowej na temat AQP2. Mam również nadzieję, że prezentowane przez ze mnie wyniki oraz dalszy postęp wiedzy w tym zakresie w przyszłości posłużą w pracy hodowlanej a także w diagnozowaniu i leczeniu chorób nerek oraz zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej u tych grup zwierząt.

-
- Altunbas K i in. Renal expression and function of aquaporin 1 and aquaporin 4 in cattle. *Biotech. Histochem* 2013, 6: 350-355.
- Bauchet AL i in. Immunohistochemical identification of kidney nephron segments in the dog, rat, mouse, and cynomolgus monkey. *Toxicol. Pathol.* 2011, 39: 1115-1128.
- Bliss DZ. Dietary fiber in conservative management of chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 2004, 19: 1069-1070.
- Bonilla-Felix M. Development of water transport in the collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004, 287: F1093-F1101.
- Christensen BM i in. Localisation and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2000, 278: F29-F42.
- Dratwa A. Atrial natriuretic peptide and renal haemodynamics in newborn calves. *Acta Vet. Brno* 2006, 75, 477-483.
- Drolet R. Urinary system. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Disease of swine*. 10th ed. Oxford: Wiley-blackwell, 2012, pp. 263-283.
- Earm JH i in. Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9: 2181-2193.
- Fenton R i in. Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105: 3134-3139.
- Fioletto P i in. Glomerular filtration rate is increased in man by the infusion of both D,L-3-hydroxybutyric acid and sodium D,L-3-hydroxybutyrate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987, 65: 331-338.
- Hoffert J Di in. Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser²⁶⁹ potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J. Biol. Chem.* 2008, 36: 24617-24627.
- Holdbäck U i Aperia A. Molecular determinants of sodium and water balance during human development. *Semin. Neonatol.* 2003, 8: 291-299.
- Jolliff D i Mahan DC. Effect of dietary inulin and phytase on mineral digestibility and tissue retention weanling and growing swine. *J. Anim. Sci.* 2012, 90: 3012-3022.
- Ketz HA. Comparative studies on renal function in domestic animals. *Arch. Exp. Vet. Med.* 1960, 14: 411-419.
- Kishore BK i in. Rat renal arcade segment expressed vasopressin-regulated water channel and vasopressin V₂ receptor. *J. Clin. Invest.* 1996, 97: 2733-2771.
- Loffing J i in. Localisation of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000, 278: F530-F539.
- Lynch MB i in. The effect of high and low dietary crude protein and inulin supplementation on nutrient digestibility, nitrogen excretion, intestinal microflora and manure ammonia emissions from finisher pigs. *Animal* 2007, 1: 1112-1121.

- Mair C i in. Impact of inulin and a multispecies probiotic formulation on performance, microbial ecology and concomitant fermentation patterns in newly weaned piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2010, 94: 164-177.
- Moeller HB i Fenton RA. Cell biology of vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Eur. J. Physiol.* 2012, 464: 133-144.
- Moeller HB i in. Serine 269 phosphorylated aquaporin-2 is targeted to the apical membrane of collecting duct principal cells. *Kidney Int.* 2009, 3: 295-303.
- Nasir O I in. Effect of gum arabic (*Acacia senegal*) on water and electrolyte balance in healthy mice. *J. Ren. Nutr.* 2008, 8: 230-238.
- Németh-Cahalan K i in. Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability. *J. Gen. Physiol.* 2004, 123: 573-580.
- Nielsen S i in. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 11663-11667.
- Pilarczyk B i in. Liver and kidney concentrations of selenium in wild boars (*Sus scrofa*) from northwestern Poland. *Eur. J. Wild Res.* 2010, 56: 797-802.
- Rojek A i in. Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. *PNAS* 2006, 15: 6037-6042.
- Ruckebusch i in. The urinary collecting and voiding system. In: Ruckebusch Y, Phaneuf LP, Dunlop R, editors. *Physiology of small and large animals*. 1st ed. Philadelphia: BC Decker, 1991, pp. 184-188.
- Sands JM i in. Vasopressin-elicited water and urea permeabilities in IMCD in hypercalcemic rats. *Am. J. Physiol.* 1998, 274: F978-F985.
- Sasaki S. Aquaporin 2: From discovery to molecular structure and medical implications. *Mol. Aspects Med.* 2012, 33: 535-546.
- Takata K i in. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem. Cell Biol.* 2008, 130: 197-209.
- Tsukahara H i in. Renal water channel expression in newborns: Measurement of urinary excretion of aquaporin 2. *Metabol.* 1998, 47: 1344-1347.
- Untea A i in. Availability of microelements in recently weaned piglets fed diet supplemented with inulin. *Czech J. Anim. Sci.* 2013, 58: 369-374.
- Valenti G i in. Urinary aquaporin 2 and calciuria correlate with the severity of enuresis in children. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11: 1873-1881.
- Wilson JL i in. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin. Exp. Nephrol.* 2013, 6: 751-764.
- Yasuda K i in. Supplemental dietary inulin influences expression of iron and inflammation related genes in young pigs. *J. Nutr.* 2009, 139: 2018-2023.
- Zelenina M i in. Urinary aquaporin-2 excretion during human development. *Pediatr. Nephrol.* 2006, 21: 947-952.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Główne kierunki działalności naukowo – badawczej.

1. Czynność nerek i regulacja bilansu wodo – elektrolitowego w okresie ciąży u zwierząt gospodarskich.
2. Czynność nerek i regulacja bilansu – wodno elektrolitowego oraz zmiany wybranych wskaźników fizjologicznych i biochemicznych u noworodków zwierząt gospodarskich.
3. Wpływ nadmiernej podaży laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym na bilans wodno - elektrolitowy, wybrane wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i fizjologiczne u cieląt w okresie neonatalnym.
4. Analiza składu białkowego płynów ustrojowych młodych zwierząt gospodarskich oraz prace dotyczące badań z zakresu proteomiki.
5. Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze.

1. Czynność nerek i regulacja bilansu wodo – elektrolitowego w okresie ciąży u zwierząt gospodarskich.

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 5, w następujących pozycjach: A.1.1, A.1.2, A.1.4., A.1.6., D.1.1., D.1.2., D.1.4.

Od momentu zapłodnienia w organizmie przyszłej matki zachodzi szereg zmian. Modyfikacji czynnościowej ulega wiele narządów i układów. Zmienia się m.in. aktywność mechanizmów regulujących stan dynamicznej równowagi (steady-state) w utrzymaniu, której wiodącą rolę odgrywają nerki. Ich wydolność jest warunkiem zachowania zdrowia ciężarnej samicy oraz urodzenia żywego i zdrowego potomstwa. W zakresie gospodarki wodno – elektrolitowej zmiany te obejmują przede wszystkim zwiększenie wydzielania i zmiany aktywności wielu hormonów zarówno antynatriuretycznych, jak i natriuretycznych oraz wzrost nerkowego zatrzymywania i wydalania wielu składników. Zagadnienia dotyczące zmian gospodarki wodno – elektrolitowej oraz głównych mechanizmów odpowiedzialnych za ich regulację u zwierząt gospodarskich były nieliczne i omawiały jedynie wybrane okresy ciąży (głównie okres okołoporodowy). W związku z powyższym podjęto się badań, których celem w pierwszym etapie było prześledzenia zmian wybranych wskaźników czynności nerek oraz parametrów osocza krwi i moczu u kóz podczas całego okresu ciąży. Cięższe ciąży w porównaniu z pojedynczymi, stawiają przed organizmem samicy niewątpliwie większe wymagania. U samic naturalnie jednorodnych ciąży wielopłodowe występują niezmiernie rzadko, a każda z nich obarczona jest większym ryzykiem niewydolności mechanizmów homeostatycznych, czego wyrazem są m.in. wcześniejsze porody, zatrucia ciążowe, poronienia i większa śmiertelność okołoporodowa matek i noworodków. U wielorodnych domowych przeżuwaczy tj. owiec i kóz, ciąży bliźniacze w porównaniu z pojedynczymi, mimo iż stawiają przed organizmem matki dodatkowe „wymagania” nie są obarczone tak wysokim ryzykiem, a wymienione wyżej powikłania występują zdecydowanie rzadziej. Wobec tego, że w literaturze dostępne były tylko nieliczne doniesienia dotyczące zmian czynnościowych nerek w przebiegu ciąży pojedynczych i mnogich, w drugim etapie badań podjęto się analizy i porównania zmian jakim ulegają wybrane wskaźniki czynności nerek w zakresie regulacji gospodarki wodno – elektrolitowej u kóz w ciąży pojedynczej i bliźniaczej.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono m.in., że ciąży kóz nie towarzyszą istotne zmiany wielkości filtracji kłębkowej (GFR). Potwierdzeniem tego było brak istotnych różnic między wartościami klirensów inuliny, stężeń w osoczu krwi i oczyszczania nerkowego z endogennej kreatyniny u kóz nieciążarnych oraz w poszczególnych okresach ciąży. U kóz w ciąży bliźniaczej wielkość filtracji kłębkowej

niemal przez cały okres ciąży (za wyjątkiem ostatniego tygodnia), jest tylko nieznacznie (i nieistotnie) wyższa w porównaniu z obserwowaną u kóz w ciąży pojedynczej. Stwierdzono również, że gospodarka azotem u ciężarnych kóz jest oszczędna. Niemal od początku ciąży wzrastało nerkowe zatrzymanie mocznika. Było ono bardziej nasilone u kóz w ciąży bliźniaczej, choć uzyskane różnice nie znajdują potwierdzenia statystycznego. Mimo zwiększenia kanalikowej resorpcji mocznika, jego stężenie w osoczu krwi nie ulegało wzrostowi, a w ostatnich 3. miesiącach ciąży (zwłaszcza bliźniaczej) wykazywało nawet tendencję spadkową. Wynika to najprawdopodobniej ze zwiększonego recyklingu mocznika do światła przewodu pokarmowego i nasilenia obiegu tego metabolitu w układzie krew – żwacz - krew. Molalność osocza krwi oraz stężenie w nim trzech głównych elektrolitów: jonów sodowych, potasowych i chlorkowych u kóz ciężarnych i nieciężarnych nie różniły się istotnie i utrzymywane były w granicach norm referencyjnych. Wskazuje to na dużą sprawność i pełną wydolność mechanizmów regulujących homeostazę wodno - elektrolitową zarówno u kóz w ciąży pojedynczej, jak i bliźniaczej. Niezależnie od stanu fizjologicznego nerkowe zatrzymywanie jonów sodowych i chlorkowych było u kóz bardzo duże. Kozy od samego początku ciąży pojedynczej zwiększały nerkowe oczyszczanie z potasu, podczas gdy wydalanie sodu pozostawało względnie stałe, natomiast u kóz w ciąży bliźniaczej od 2. miesiąca wzrastał klirens sodu, a wydalany ładunek potasu nie zmieniał się. Zmiany te były najprawdopodobniej spowodowane różnymi u obu grup koncentracjami aldosteronu i progesteronu, a także ich wzajemną proporcją. W warunkach fizjologicznych nie obserwowano istotnych różnic w koncentracjach wapnia, fosforu nieorganicznego i magnezu w osoczu krwi zarówno między kozami ciężarnymi i nieciężarnymi, jak i między zwierzętami w ciąży pojedynczej i bliźniaczej. Za wyjątkiem ostatniego tygodnia ciąży oczyszczanie nerkowe z wapnia i fosforu nieorganicznego było mniejsze niż u zwierząt nieciężarnych, ale zmiany te nie wydają się mieć istotnego znaczenia dla uzupełniania wzrastającego wraz z przebiegiem ciąży zapotrzebowania matki i płodu (płodów) na te makroelementy. Istotną rolę w tym zakresie odgrywa natomiast nerkowa retencja magnezu, która od samego początku ciąży stopniowo wzrastała i u kóz w ciąży bliźniaczej była wyraźnie większa.

2. Czynność nerek i regulacja bilansu – wodno elektrolitowego oraz zmiany wybranych wskaźników fizjologicznych i biochemicznych u noworodków zwierząt gospodarskich.

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 5, w następujących pozycjach: A.1.3., A.1.5., A.1.7., A.1.8., A.1.9., D.1.3., D.1.5.

Podczas okresu neonatalnego, nerki noworodków ulegają intensywnym adaptacyjnym zmianom do życia pozamacicznego. W okresie tym obserwowane są m.in. zwiększenie przepływu krwi przez nerki (RBF), wzrost wielkości filtracji kłębkowej (GFR), wzrost zdolności absorpcyjnej i sekrecyjnej nerek a także zdolności do produkcji zagęszczonego moczu. Prawidłowy przebieg tych zmian jest warunkiem zachowania równowagi wewnętrznej organizmu, prawidłowego wzrostu i rozwoju, i tym samym zdrowia i życia noworodka. Wobec ogromnego znaczenia adaptacyjnych zmian czynności nerek w okresie postnatalnym oraz wobec tego, że w literaturze brak jest pełnych informacji na ten temat u zwierząt gospodarskich podjęto się badań, których celem była analiza szczelności bariery filtracyjnej oraz nerkowego wydalania białek niskocząsteczkowych w okresie neonatalnym u koźląt, analiza wpływu enzymu konwertującego na osoczną koncentrację miedzi i żelaza u cieląt oraz analiza nerkowej regulacji homeostazy potasu i roli w tym zakresie przedsionkowego peptydu natiuretycznego (ANP).

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono m.in., że w pierwszych trzech tygodniach życia koźląt przepuszczalność bariery filtracyjnej dla białka o masie cząsteczkowej 81 kDa jest zwiększona. Wysunięto koncepcję, że zwiększone wydalanie białka o tej masie cząsteczkowej świadczyć może o nieszczelności bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych. Stwierdzono również, że pourodzeniowe procesy „uszczelniania” bariery filtracyjnej i usprawniania procesów resorpcyjnych w komórkach nerkowych są rozłożone w czasie i wykazują zmienność osobniczą. Analiza składu białkowego moczu pozwoliła również na stwierdzenie, że u koźląt w okresie neonatalnym występuje białkomocz o charakterze selektywnym. U badanych noworodków obserwowano dynamiczne zmiany nerkowego wydalania poszczególnych frakcji białek wraz z moczem, szczególnie w zakresie białek o małej masie cząsteczkowej (LMW). Uzyskane rezultaty pozwoliły na potwierdzenie wcześniejszych wyników badań i stwierdzenie, że u koźląt występuje zwiększona przepuszczalność bariery filtracyjnej, zwłaszcza w pierwszych dniach życia. Najprawdopodobniej obserwowana zwiększona przepuszczalność bariery filtracyjnej dla białek w pierwszych dniach życia może stanowić mechanizm adaptacyjny do usuwania nadmiernej ilości białek z organizmu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że u cieląt w pierwszych siedmiu dniach życia nerkowe wydalanie potasu zależy głównie od jego kanalikowej resorpcji, podczas gdy klirens tego elektrolitu, w celu utrzymania właściwego stężenia K^+ zależy przede wszystkim od jego wydalania wraz z moczem. Stwierdzono również, że nerki cieląt są w pełni sprawne do regulacji potasu w osoczu krwi w okresie neonatalnym. Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto koncepcje, że ANP nie jest bezpośrednio zaangażowany w regulację kanalikowego wchłaniania K^+ w pierwszych 7 dniach życia cieląt, jakkolwiek prawdopodobnie przyczynia się do jego nerkowego wydalania wraz z moczem.

Analiza koncentracji miedzi i żelaza w osoczu krwi cieląt wykazała, że ich stężenia ulegały dynamicznym zmianom w pierwszych dniach życia. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost wraz z wiekiem osoczowej koncentracji miedzi oraz statystyczne zmniejszenie się w ciągu pierwszych trzech dni życia stężenia żelaza. Podanie cielętom kaptoprylu (inhibitora enzymu konwertującego) spowodowało istotne obniżenie koncentracji w osoczu krwi żelaza szczególnie w pierwszych dniach życia. Nie stwierdzono istotnych zmian koncentracji miedzi przed i po podaniu kaptoprylu.

Jak wspomniano wcześniej okres neonatalny jest czasem intensywnej adaptacji organizmu do nowego środowiska. Cielęta noworodki, w porównaniu do noworodków innych gatunków zwierząt wykazują po urodzeniu dużą dojrzałość somatyczną, nie mniej jednak podobnie jak nerki czynności poszczególnych narządów nie wykazują pełnej sprawności w porównaniu do dorosłego bydła. W efekcie adaptacyjnych modyfikacji w pierwszych dniach życia cieląt zmianom ulega wiele parametrów fizjologicznych jak i wskaźników biochemicznych. Wyniki prowadzonych badań w tym zakresie, dostarczyły nowych informacji na ten temat u cieląt we wczesnym okresie pourodzeniowym. Stwierdzono m.in., że u cieląt w pierwszym tygodniu życia wzrasta w osoczu krwi poziom triglicerydów. Obserwowano również niskie stężenie cholesterolu całkowitego tuż po urodzeniu i szybki wzrost tego wskaźnika w pierwszych 7 dniach życia cieląt. Stwierdzono także, że koncentracje w osoczu krwi lipoprotein o dużej gęstości (HDL) i małej gęstości (LDL) zwiększały się wraz z wiekiem cieląt. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano również, różnice w niektórych wskaźnikach fizjologicznych osocza krwi cieląt karmionych mlekiem matki lub preparatem mlekozastępczym. Stwierdzono m.in., że u cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym w porównaniu do cieląt karmionych mlekiem matki występują niższe stężenia w osoczu krwi białka całkowitego i albuminy. U zwierząt karmionych preparatem mlekozastępczym parametry te dodatkowo ulegały obniżeniu wraz z wiekiem. Stwierdzono, że niskie i zmniejszające się stężenie białka całkowitego oraz albuminy było najprawdopodobniej spowodowane niższą strawnością białek w preparacie mlekozastępczym. Wykazano także, że u cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym zwłaszcza w

drugim tygodniu życia wyższa jest w porównaniu do cieląt karmionych mlekiem matki koncentracja mocznika. Najprawdopodobniej zwiększenie koncentracji tego parametru spowodowane było brakiem substancji biologicznie czynnych, co spowodowało przewagę procesów katabolicznych nad anabolicznymi. U obu badanych grup zwierząt koncentracja wapnia w osoczu krwi zmniejszała się wraz wiekiem. Stwierdzono również, że w osoczu krwi cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym w porównaniu z cielętami karmionymi mlekiem matek stężenie cynku było niższe. Najprawdopodobniej obserwowane różnice mogły być efektem zwiększonej zdolności magazynowania tego mikroelementu w wątrobie a także mniejszej biodostępności cynku w preparacie mlekozastępczym w porównaniu z mlekiem matki. Nie stwierdzono różnic w koncentracjach sodu i chlorków w osoczu krwi u cieląt żywionych mlekiem naturalnym lub preparatem mlekozastępczym.

3. Wpływ nadmiernej podaży 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 5, w następujących pozycjach: A.1.10., A.1.12., A.1.14., A.1.16., D.1.6., D.1.8., D.1.9.

Największe straty ekonomiczne w wielkostadnej hodowli bydła występują w okresie wychowu cieląt. Szczególnie trudne są pierwsze 2-3 tygodnie życia. Przyjmuje się, że główną przyczyną wysokiej śmiertelności neonatalnej cieląt są biegunki. Pomimo postępu w dziedzinie profilaktyki, metod diagnostycznych oraz nowych koncepcji antybiotykoterapii i leczenia wspomagającego, wiele stad bydła zarówno mięsnego jak i mlecznego wciąż boryka się z tym problemem. Przyczyną niepowodzeń w ograniczeniu liczby zachorowań oraz strat zwierząt z tego powodu, jest ogromna złożoność czynników zakaźnych i inwazyjnych wywołujących biegunkę. Wśród wielu czynników powodujących biegunkę są m.in. złe warunki zoohigieniczne a także nieprawidłowe skarmianie młodych zwierząt. Mleko i preparaty mlekozastępcze stanowią osobną i często bagatelizowaną przez hodowców grupę czynników wywołujących zaburzenia pokarmowe wśród cieląt po okresie odpajania siałą. Często popełnianym przez hodowców błędem jest przekarmianie i związane z tym podawanie cielętom zbyt dużej ilości laktozy. Ogólnie wiadomo, że laktoza to osmotycznie czynny dwucukier występujący w mleku wszystkich ssaków. Podczas przekarmiania cieląt lub podawania nieprawidłowo preparatów mlekozastępczych dochodzi do gromadzenia

się niestrawionej laktozy w świetle jelita i zwiększenia ciśnienia osmotycznego, które prowadzi do ściągnięcia wody i powstania biegunki osmotycznej. W efekcie dodatkowych strat wody wywołanych nadmiarem laktozy w diecie może dojść do zaburzeń homeostazy organizmu. W związku z powyższym podjęto się badań, których celem była analiza wpływu nadmiernej podaży laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym na bilans wodno - elektrolitowy, wybrane wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i fizjologiczne u cieląt w okresie neonatalnym. Doświadczenie przeprowadzono na trzech grupach cieląt, w pierwszych trzech tygodniach życia, którym podawano dwukrotnie wraz z preparatem mlekozastępczym dodatkowej ilości laktozy.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, że u wszystkich badanych cieląt po dwukrotnym podaniu wraz z preparatem mlekozastępczym dodatkowej ilości laktozy obserwowano luźne stolce o charakterystycznym ciemnozielonym zabarwieniu. Częstsze wydalanie stolców o luźniejszej konsystencji obserwowano szczególnie w 2 i 3 tygodniu życia cieląt. Obserwowane ciemnozielone, luźne stolce z domieszką śluzu były najprawdopodobniej rezultatem przyspieszonego pasażu treści pokarmowej wywołanego nadmiarem laktozy w diecie. Ciemnozielone zabarwienie mogło być związane z występowaniem w kale zwiększonego poziomu bilirubiny, która w wyniku szybszego przepływu treści pokarmowej nie uległa przemianie w sterkobilinogen. Luźniejsza konsystencja stolca spowodowana była niewątpliwie zwiększoną zawartością wody, która uległa odpływowi do światła jelita z powodu zalegających tam niestrawionych resztek laktozy. Częstsze i luźniejsze stolce obserwowane u cieląt w 2 i 3 tygodniu życia spowodowane były najprawdopodobniej mniejszą strawnością laktozy w tym okresie.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że u cieląt po podaży dodatkowej ilości laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym zmianom nie ulega koncentracja białka całkowitego (TP), albuminy (Alb), glukozy, Na^+ , K^+ , Cl^- , Cu^{2+} , fosforu nieroganicznego (iP), Mg^{2+} oraz hematokrytu (Ht), hemoglobiny (Hb) i średniej objętości krwinek czerwonych (MCV). W pierwszym tygodniu życia po podaży cielętom dodatkowej porcji laktozy istotnemu obniżeniu uległa koncentracja Fe^{2+} . Natomiast u wszystkich cieląt zarówno w 1 jak i 2 oraz 3 tygodniu życia stwierdzono zmniejszenie się stężenia cynku w osoczu krwi. Najprawdopodobniej obserwowane obniżenie stężenia Fe^{2+} i Cu^{2+} było wypadkową działania wielu czynników, jednym z nich mogło być ograniczone wchłanianie tych mikroelementów w jelitach w wyniku przyspieszonego pasażu treści jelitowej wywołanego podażą cielętom zbyt dużej ilości laktozy.

Analiza zmian koncentracji ANP oraz ALDO i AVP w osoczu krwi cieląt przed i po podaniu wraz z preparatem mlekozastępczym dodatkowej ilości laktozy pozwoliła na stwierdzenie, że hormony te skutecznie reagują na dodatkowe straty wody wraz kałem. W prezentowanych badaniach obserwowano

przeciwstawną tendencje zmian antagonistycznie działających hormonów, czego efektem był względnie stabilny poziom głównych elektrolitów i stabilne ciśnienie osmotyczne osocza krwi.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono również, że w pierwszym tygodniu życia po podaniu cielętom dodatkowej ilości laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym nastąpił istotny wzrost ekspresji apolipoproteiny A-IV (apoA-IV) w osoczu krwi. W tym samym czasie nie stwierdzono istotnych różnic w koncentracjach triglicerydów, cholesterolu całkowitego i LDL, zarówno przed jak i po podaniu dodatkowej ilości laktozy. Obserwowany stopniowy, niewielki wzrost HDL w osoczu krwi cieląt, pozwala na przypuszczenie, iż zwiększenie się tej frakcji lipidowej po podaniu dodatkowej ilości laktozy związane jest ze wzrostem osoczowej ekspresji apoA-IV. W prezentowym doświadczeniu zastosowanie preparatu mlekozastępczego z dodatkową ilością laktozy, poza zwiększeniem poziomu apoA-IV nie wydają się mieć wpływu na zmiany poszczególnych frakcji lipidowych w osoczu krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia.

4. Analiza składu białkowego płynów ustrojowych młodych zwierząt gospodarskich oraz prace dotyczące badań z zakresu proteomiki.

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 5, w następujących pozycjach: A.1.9., A.1.14., A.1.16., A.2.1., D.1.7.

Badania proteomiczne oparte na metodach rozdziału i identyfikacji białek w odróżnieniu do metod klasycznych dają możliwość szybkiej i jednoczesnej analizy nawet setek białek. Określenie profili białkowych a w szczególności identyfikacja różnic w składzie białkowym lub ekspresji poszczególnych białek pod wpływem działania określonego czynnika, dają szerokie możliwości w badaniach danego układu biologicznego. Poprzez porównanie oraz analizę zmian w składzie białkowym, możliwe jest wyodrębnienie białek kluczowych dla danego procesu biologicznego. Analiza zmian ekspresji białek w odpowiednio zaplanowanym doświadczeniu, pozwala również na dokładniejsze zrozumienie i identyfikacje mechanizmów zarówno fizjologicznych jak i patofizjologicznych.

Wykorzystanie nowoczesnych technik proteomicznych (elektroforeza 2D i spektrometria mas typu MALDI-TOF) pozwoliły na określenie zmian profilu białkowego osocza krwi cieląt w pierwszych 7 dniach życia. Wśród 74 analizowanych spotów białkowych, 16 wykazywało zmienną ekspresję w badanym okresie. W efekcie przeprowadzonych badań zidentyfikowano m.in. białka związane z transportem i metabolizmem lipidów: apolipoproteinę A-I (apoA-I) i apoA-IV, których ekspresja gwałtownie wzrosła po pierwszym podaniu

siary. Podawanie bogatej w tłuszcz siary i mleka powodowało dalszy wzrost ekspresji tych białek wraz z wiekiem cieląt. Wzrost ekspresji apoA-I i apoA-IV był adekwatny do zmian stężenia lipidów w osoczu krwi cieląt.

W badaniach nad składem białkowym osocza krwi cieląt przed i po podaniu wraz z preparatem mlekozastępczym dodatkowej ilości laktozy, spośród blisko 430 badanych spotów zidentyfikowano 6, których ekspresja istotnie się zmieniła. W odpowiedzi na nadmiar laktozy w diecie wzrosła ekspresja białek ostrej fazy: fibrynogenu (Fb), glikoproteiny alpha-1B (A1BG), alpha-1 antytrypsyny (A1AT), apo A-IV oraz apolipoproteiny E (apoE). Obserwowane zmiany w ekspresji białek osocza krwi cieląt były najprawdopodobniej efektem bezpośredniego wpływu nadmiernej podaży cukru (apoA-IV, apoE) lub dodatkowych strat wody wraz z kałem obserwowanych po podaży laktozy (Fb, A1BG, A1AT). Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto koncepcje, że wzór ekspresji białek osocza krwi (zmniejszenie ekspresji: fibrynogenu, apoA-IV oraz zwiększenie ekspresji: A1BG, antyproteinazy alpha-1 i apoE) dwutygodniowych cieląt może posłużyć do określenia przyczyn biegunki u cieląt.

W badaniach dotyczących analizy składu białkowego moczu cieląt przed i po podaniu wraz z preparatem mlekozastępczym dodatkowej ilości laktozy, spośród wszystkich badanych spotów zidentyfikowano 4, których ekspresja istotnie zmniejszała się: A1AT, serotransferyna (TF), białko wiążące hormony płciowe (SHBG), cytochrom P450 2E1 (CYP2E1). Po podaniu preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy zwiększyła się ekspresja syntazy cytrynianowej ATP. Najprawdopodobniej obserwowane w moczu cieląt zmiany ekspresji SHBG i CYP2E1 spowodowane były nadmiarem cukru w diecie. Natomiast zmiany ekspresji A1AT, TF i syntazy cytrynianowej ATP prawdopodobnie były efektem dodatkowych strat wody i elektrolitów wraz z kałem. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że analiza składu białkowego moczu cieląt może posłużyć do określenia funkcji nerek i w przyszłości może być wykorzystana zarówno w praktyce zootechnicznej jak i diagnostyce weterynaryjnej.

Ciągle udoskonalanie elektroforetycznych metod rozdziału białek wymusiło konieczność poszukiwania bardziej czułych i mniej czasochłonnych metod ich wizualizacji. Pomimo tego, że na rynku dostępne są liczne, charakteryzujące się wysoką czułością barwniki fluorescencyjne, najbardziej popularne są barwniki klasyczne tj. sole srebra czy błękit coomassie. W związku z tym podjęto się badań, których celem była ocena (pod względem czułości barwienia, czasochłonności, prostoty wykonania oraz stopnia zagrożenia środowiska) dwóch metod barwienia żeli poliakrylamidowych z wykorzystaniem Coomassie Brilliant G-250. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że detekcja białek z wykorzystaniem protokołu Pinka charakteryzuje się wyższą skutecznością. Wykazano również, że metoda ta jest mniej czasochłonna od

protokołu opracowanego przez Hovinga, a także nie wymaga zastosowania obciążającego środowisko metanolu.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze.

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 5, w następujących pozycjach: A.1.11., A.1.13., A.1.15., D.1.10.

W ramach prowadzenia dodatkowych badań, niezwiązanych ściśle z głównymi kierunkami działalności naukowo - badawczej dokonano m.in. analizy budowy anatomicznej i morfologicznej nerek emu (*Dromaius novaehollandiae*). Stwierdzo m.in, że nerki samic w porównaniu do nerek samców są statystycznie większe. Średnia masa ciała badanych samców jest statystycznie mniejsza niż samic. Stwierdzona mniejsza masa nerek wydają się być zatem proporcjonalna do ich masy ciała. Świadczyć o tym może względnie podobny współczynnik nerki/masa ciała zarówno u samic jak i u samców. Stwierdzono także, że każda nerka składa się z trzech części, głowowej, środkowej i ogonowej. Histologiczna analiza wykazała, że nerki emu posiadają dwie warstwy, korę i rdzeń. Kora stanowi większą część nerek, z małymi obszarami rdzenia. W korze nerki zlokalizowane są kanaliki proksymalne i dystalne oraz dwa typy kłębuszków nerkowych (z pętlami i bez pętli). Każdy z tych kłębuszków charakteryzuje ciasno upakowane komórki mesangialne. Kanaliki proksymalne i dystalne, posiadają charakterystyczny jednowarstwowy, niski nabłonek sześcienny. Powierzchnia w świetle kanalików proksymalnych posiada rąbek szczoteczkowy, uformowany przez liczne mikrokosmki. Rdzeń nerek emu tworzy nieregularnie rozmieszczone, charakterystyczne skupienia o różnej wielkości. Rdzeń zawiera cienkie i grube ramiona pętli Henlego wyścielone jednowarstwowym nabłonkiem sześciennym oraz kanaliki zbiorcze, które posiadają jednowarstwowy nabłonek walcowaty. Wobec wzrastającego zainteresowania tym unikatowym gatunkiem ptaków oraz wobec braku w literaturze szczegółowych informacji na temat budowy anatomicznej i morfologicznej nerek emu, prezentowane wyniki niewątpliwie uzupełniają wiedzę w tym zakresie u tych zwierząt.

W badaniach dotyczących wpływu diety z różną zawartością fruktanów typu inulinowego na czynność nerek u świń, po raz pierwszy dokonano identyfikacji, lokalizacji oraz oceny ekspresji TRPM6 i TRPM7 (transient potential melastin 6 i 7). Białka te zaangażowane są w utrzymanie właściwego bilansu magnezem. Wykazano, że u świń TRPM6 zlokalizowane są w kanalikach proksymalnych i dystalnych oraz

w kanalikach zbiorczych. Natomiast TRPM7 zlokalizowano w nabłonku kanalików dystalnych i zbiorczych. Stwierdzono również, że u zwierząt którym podawano dietę wzbogaconą fruktanami typu inulinowego wzrosła nerkowa ekspresja TRPM6. Zmianom nie uległa natomiast ekspresja TRMP7. Wzrost ekspresji TRMP6 u zwierząt, którym podawano wraz z dietą fruktany typu inulinowego niewątpliwie przyczynił się do zwiększenia nerkowego zatrzymywania Mg^{2+} . Zmiany ekspresji TRPM6 wydają się być korzystnym efektem suplementacji diety fruktanami typu inulinowego.

W ramach mojej współpracy z Pomorską Akademią Medyczną współuczestniczyłam w badaniach, w efekcie których powstała praca dotycząca wpływu kombinacji różnych leków immunopresyjnych na morfologię, ultrastrukturę jak również ekspresję PCNA (proliferating cell nuclear antigen) i białek cytoszkieletu prostaty szczurów. W badaniach tych wykazano m.in., że u szczurów, którym podawano kombinacje leków z rapamycyną, bądź wprowadzano rapamycynę w trakcie trwania terapii stwierdzono zmniejszenie proliferacji zarówno komórek nabłonka gruczołowego jak i podścieliska prostaty. Prezentowane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że zastosowanie inhibitorów mTOR i tym samym zmniejszenie procesów proliferacji może mieć istotne znaczenie w leczeniu immunopresyjnym osób z chorobami nowotworowymi, szczególnie u mężczyzn z rakiem prostaty po przeszczepie nerki. Na podstawie uzyskanych wyników można również stwierdzić, że w odniesieniu tylko do prostaty najkorzystniejsze wydaje się zastosowanie kombinacji leków rapamycyna, takrolimus i prednizon. W przebiegu tego typu terapii nie tylko obserwuje się najmniejsze zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne w komórkach prostaty, ale także niewielki procent proliferujących komórek. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano również nieprawidłowości w ultrastrukturze komórek prostaty badanych szczurów. Obserwowane liczne rozdęte cysterny aparatu Golgiego i siateczki endoplazmatycznej szorstkiej, mogą świadczyć o nieprawidłowościach w procesach syntezy i sekrecji. Obserwowane zmiany wskazują na niekorzystny wpływ leków immunosupresyjnych na procesy zachodzące na poziomie komórkowym. Zaprezentowane w pracy wyniki nie tylko przyczynią się głębszego zrozumienia procesów zachodzących w prostacie u pacjentów poddanych terapii immunosupresyjnej, ale także będą pomocne w indywidualnym dobraniu jak najkorzystniejszych schematów leczenia tak, aby w przyszłości zminimalizować ryzyko występowania powikłań, szczególnie u mężczyzn planujących ojcostwo.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje 53 pozycje (9 pozycji opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, 44 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora), w tym 31 oryginalnych prac twórczych, 4 prace przeglądowe, 1 popularno – naukowa, 3 rozdziały w monografiach, 1 rozdział w podręczniku akademickim, 2 rozdziały w skrypcie akademickim i 11 doniesień i komunikatów.

Sumaryczny *impact factor* (IF) za publikacje naukowe wg listy Journal Citation Reports (JRC) zgodnie z rokiem opublikowania lub dla prac z 2016 za rok 2015 – 19,265;

Ogólna liczba punktów za publikacje naukowe wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania lub dla prac z 2016 za rok 2015 oraz na podstawie rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 27 października 2015 – 504;

Łączna liczba cytowań wg Web of Science (Sareło/Michalek K) – 22;

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science – 3.

Tabelaryczne zestawienie osiągnięć w pracy naukowo-badawczej

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
1. Oryginalne opublikowane prace twórcze	5	25	30
a. w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)	2	18	20
Medycyna Weterynaryjna	2	1	3
Acta Veterinaria Hungarica		1	1
Folia Biologica (Krakow)		4	4
Polish Journal of Veterinary Sciences		1	1
Biotechnic and Histochemistry		1	1
Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences		3	3
Turkish Journal of Zoology		1	1
Turkish Journal of Biology		1	1
Archives Animal Breeding		2	2
Canadian Journal of Animal Science		1	1
Journal of Physiology and Pharmacology		1	1
Drug Desing and Developmental Theraphy		1	1
b. w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	3	7	10
Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series: Animal Husbandry/Veterinary Medicine	1	1	2
Acta Scientiarum Polonorum. Seria Zootechnica		3	3
Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica (obecnie : Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica)	2	3	5
2. Inne publikacje	4	15	19
a. doniesienia i komunikaty	2	9	11
b. prace przeglądowe	1	3	4
c. prace popularno – naukowe	1		1
d. rozdziały w monografiach		3	3
3. Podręczniki i skrypty		3	3
4. Prace recenzowane nieopublikowane		1	1
a. w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)		1	1
Razem	9	44	53

Tabelaryczne zestawienie osiągnięć w pracy naukowo-badawczej

Rodzaj publikacji	Przed		Po uzyskaniu stopnia doktora				Ogółem	
	uzyskaniem		Jednotematyczny		Pozostałe			
	stopnia doktora	cykl publikacji	cykl publikacji	publikacje	publikacje	publikacje	IF	pkt. wg
	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW
Prace oryginalne w czasopismach z bazy JCR	0,472 (2)*	20	4,06 (4)	80	11,733 (14)	254		
Prace oryginalne w czasopismach spoza bazy JCR		16 (3)		10 (1)		55 (7)		
Artykuły przeglądowe		(1)			3,0 (3)	49		
Prace popularno-naukowe		(1)						
Doniesienia i komunikaty		(2)				(9)		
Rozdziały w monografiach						(15)** (3)		
Rozdziały w podręcznikach i skryptach						(5)** (3)		
Ogółem							19,265 (53)	504

IF - Współczynnik Impact factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla prac z roku 2016 wykazano IF za rok 2015;

pkt. wg MNiSW - Liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy; dla prac z roku 2016 wykazano liczbę punktów MNiSW za rok 2015;

* - W nawiasach podano liczbę publikacji;

** - Liczba punktów MNiSW na podstawie rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 27 października 2015.

6. Udział w krajowych projektach badawczych

- „Wybrane wskaźniki czynności nerek u kóz w ciąży pojedynczej i bliźniaczej”, 2001-2006, Komitet Badań Naukowych nr 2 P06D 03626 (pierwszy wykonawca);
- „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 (pierwszy wykonawca projektu).;
- „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);
- „Wpływ suplementacja diety inuliną na proteom nerek i moczu”, 2011-2013, Narodowe Centrum Nauki, N N3311 519340 (wykonawca).

Szczecin, dnia 3 października 2016 roku

Katarzyna Michulek