

# AUTOREFERAT

---

## OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH, DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

---

### **dr inż. Adam Lepczyński**

---

KATEDRA FIZJOLOGII, CYTOBIOLOGII I PROTEOMIKI  
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT  
ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE  
ul. Klemensa Janickiego 29,  
71-270 Szczecin  
e-mail: adam.lepczynski@zut.edu.pl

---

**SZCZECIN 2019**

---

## SPIS TREŚCI

---

I. DANE OSOBOWE .....	3
II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE .....	3
III. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH .....	3
IV. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE WYNIKAJĄCE Z ART. 219 UST. 1 PKT. 2b USTAWY PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (Dz.U.2018.0.1668 - USTAWA Z DNIA 20 LIPCA 2018 r.) .....	4
A. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	4
B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	4
Wprowadzenie i uzasadnienie podjęcia badań.....	5
Cel i zakres prac badawczych .....	8
Omówienie wyników prac wskazanych, jako szczególne osiągnięcie naukowe .....	9
Podsumowanie .....	21
Bibliografia .....	23
V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.....	26
VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ. ....	28
VII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH .....	32
Opis pozostałego dorobku naukowo-badawczego.....	32
a) <i>Przed uzyskaniem stopnia doktora</i> .....	32
b) <i>Po uzyskaniu stopnia doktora</i> .....	34
Podsumowanie dorobku naukowego .....	47

## I. DANE OSOBOWE

Imię i nazwisko: Adam Lepczyński

Miejsce pracy: Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
ul. Klemensa Janickiego 32,  
71-270 Szczecin

Dane kontaktowe: Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
ul. Klemensa Janickiego 29,  
71-270 Szczecin

## II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

04.02.2003 r. inżynier, kierunek studiów: zootechnika, Akademia Rolnicza w Szczecinie,  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

24.06.2004 r. magister, kierunek studiów: zootechnika, Akademia Rolnicza w Szczecinie,  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,  
temat dysertacji: „*Analiza polimorfizmu zlokalizowanego w genie somatoliberyny (GHRH) jako przypuszczalnego locus cech ilościowych odpowiadających za użytkowość mleczną bydła*”,  
Promotor: prof. dr hab. Marek Kmieć

10.05.2010 r. doktor nauk rolniczych, dyscyplina: zootechnika, specjalność: fizjologia zwierząt;  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział  
Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,  
temat dysertacji: „*Analiza proteomu osocza krwi cieląt żywionych naturalnie i preparatem mlekozastępczym*”,  
Promotor: prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak

## III. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.09.2010 – 31.08.2011 r. Katedra Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i  
Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w  
Szczecinie  
stanowisko: adiunkt w wymiarze ½ etatu.

01.09.2011 r. – obecnie Katedra Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i  
Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w  
Szczecinie  
stanowisko: adiunkt w wymiarze 1/1 etatu.

**IV. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE WYNIKAJĄCE Z ART. 219 UST. 1 PKT. 2b USTAWY PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (Dz.U.2018.0.1668 - USTAWA Z DNIA 20 LIPCA 2018 r.)**

**A. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

**„WPŁYW SUPLEMENTACJI DIETY SUSZEM Z KORZENIA CYKORII NA ZMIANY PROTEOMU WYBRANYCH PŁYNÓW USTROJOWYCH, TKANEK I NARZĄDÓW ORAZ WSKAŹNIKÓW FIZJOLOGICZNYCH U ROSNĄCYCH ŚWIŃ”**

**B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

**I.1. Lepczyński A.**, Herosimczyk A., Ożgo M., Skomiał J., Taciak M., Barszcz M., Bereżecka N., 2015, Dietary supplementation with dried chicory root triggers changes in the blood serum proteins engaged in the clotting process and the innate immune response in growing pigs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66, 47-55.

(IF : **2,804**; MNiSW: **25**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącej roli w: opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, gromadzeniu materiału biologicznego do analiz laboratoryjnych i danych do analiz statystycznych, przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych i statystycznych oraz samodzielnym sformułowaniu wniosków, doborze piśmiennictwa z zakresu przedmiotu, napisaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 55%***

**I.2. Lepczyński A.**, Herosimczyk A., Barszcz M., Ożgo M., Taciak M., Skomiał J., 2016, Inulin-type fructans trigger changes in iron concentration and activity of bone metabolism biomarkers in blood plasma of growing pigs, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 25, 343-347.

(IF : **1,024**; MNiSW: **20**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącej roli w: opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, gromadzeniu materiału biologicznego do analiz laboratoryjnych i danych do analiz statystycznych; współdziałanie w przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych i statystycznych; a także samodzielnym sformułowaniu wniosków, doborze piśmiennictwa z zakresu przedmiotu, napisaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 50%***

**I.3. Lepczyński A.**, Herosimczyk A., Ożgo M., Marynowska M., Pawlikowska M., Barszcz M., Taciak M., Skomiał J., 2017, Dietary chicory root and chicory inulin trigger changes in energetic metabolism, stress prevention and cytoskeletal proteins in the of growing pigs – a proteomic study, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101, e225-e236.

(IF : **1,607**; MNiSW: **30**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącej roli w: opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, gromadzeniu materiału biologicznego do analiz laboratoryjnych i danych do analiz statystycznych, przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych i statystycznych oraz samodzielnym sformułowaniu wniosków, doborze piśmiennictwa z zakresu przedmiotu, napisaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 55%***

**I.4. Lepczyński A.**, Herosimczyk A., Ożgo M., Barszcz M., Taciak M., Skomiał J., 2019, Modification of ileal proteome in growing pigs by dietary supplementation with inulin or dried chicory root, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 28, 177–186.

(IF : **0,875**; MNiSW: **20**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wiodącej roli w: opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, gromadzeniu materiału biologicznego do analiz laboratoryjnych i danych do analiz statystycznych, przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych i statystycznych, samodzielnym sformułowaniu wniosków, doborze piśmiennictwa z zakresu przedmiotu, napisaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu edytorskiego (autor korespondencyjny). **Mój udział procentowy szacuję na 50%***

Wartości wskaźnika *impact factor* publikacji podano według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania (dla publikacji z 2019, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny).

Punktacja została przyznana na podstawie przepisów wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, które określają wykaz czasopism naukowych ogłoszonych komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 25 stycznia 2017 r., jako wykaz czasopism naukowych obowiązujący podczas ewaluacji za lata 2017-2018 (w przypadku publikacji wydanych w 2019 roku, przydzielono punkty za rok 2018).

Sumaryczny *impact factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR) = **6,31**

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według wykazu czasopism naukowych MNiSW = **95**

Kopie publikacji wchodzących w skład szczególnego osiągnięcia naukowego stanowią załącznik nr 4. Oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac wraz z określeniem ich indywidualnego wkładu stanowi załącznik nr 5.

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

### Wprowadzenie i uzasadnienie podjęcia badań



Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowią cztery oryginalne artykuły, opublikowane w latach 2015 – 2019, dotyczące zastosowania w diecie świń, bogatego we fruktany typu inulinowego, suszu z korzenia cykorii pod wspólnym tytułem: „**Wpływ suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na zmiany proteomu wybranych płynów ustrojowych, tkanek i narządów oraz wskaźników fizjologicznych u rosnących świń**”. Badania wykonano w ramach projektu **NCN „SONATA”, 2012/05/D/NZ9/01604**, w którym pełniłem funkcję **głównego wykonawcy**. Przeprowadzone badania miały na celu określenie wpływu dodatku do diety rosnących prosiąt substancji o charakterze prebiotycznym, podawanych w formie naturalnej (susz z korzenia cykorii) na parametry fizjologiczne związane z metabolizmem energetycznym, statusem immunologicznym, a także statusem mineralnym. Wyżej wymienione wskaźniki przeanalizowano zarówno z wykorzystaniem klasycznych metod biochemicznych, jak również zaadaptowano wciąż rzadko wykorzystywaną w badaniach zootechnicznych, koncepcję nutriproteomiczną. Celem analiz nutriproteomicznych jest kompleksowa analiza białek badanych tkanek bądź płynów ustrojowych, by oszacować zmiany ich relatywnej koncentracji w wyniku podaży czynnika żywieniowego, którym w prezentowanych badaniach był bogaty w fruktany typu inulinowego susz z korzenia cykorii.

Stosowanie antybiotyków jako dodatków do pasz z przeznaczeniem dla zwierząt gospodarskich istotnie wpływało na efekt ekonomiczny chowu tych zwierząt. Głównym efektem stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu było przeciwdziałanie nieżytom i chorobom przewodu pokarmowego, powodowanym przez potencjalnie patogenną florę bakteryjną, tym samym pozytywnie wpływając na parametry odchowu takie jak dobowe przyrosty masy ciała oraz czas tuczu. Nie mniej

jednak, stosowanie ich wiązało się m.in. z ryzykiem rozwoju zjawiska antybiotykooporności bakterii (Al-Dobaib i Mousa, 2009). W związku z tym, z dniem 1 stycznia 2006 roku wprowadzono we wszystkich krajach UE definitywny zakaz stosowania antybiotyków, jako stymulatorów wzrostu w produkcji zwierzęcej (Dz.U. L268, rozporządzenie nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt). Dlatego też koniecznym stało się poszukiwanie naturalnych dodatków paszowych, które mogłyby z powodzeniem zastąpić antybiotyki i pozytywnie wpłynąć na skład mikrobiomu przewodu pokarmowego zwierząt (Marquardt i Li, 2018). Znaczenie tego problemu w żywieniu świń podkreśla fakt, że badania dotyczące równowagi mikroflory jelitowej tych zwierząt realizowane są w ramach „Europejskiej sieci ds. czynników wpływających na równowagę mikrobiomu żołądkowo-jelitowego i jego wpływu na zdrowie świń (PiGutNet)” Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (ang. COST) poddziałanie FA1401, grupa robocza 3 (Trevisi i in., 2015).

Jedną z proponowanych alternatyw dla antybiotyków paszowych są związki o właściwościach prebiotycznych. Koncepcja prebiotyków zakłada, że są to składniki diety odporne na działanie enzymów trawiennych gospodarza, które przez selektywną stymulację wzrostu i/lub aktywności jednego rodzaju lub ograniczonej liczby bakterii w przewodzie pokarmowym działając bezpośrednio lub pośrednio wpływają korzystnie na stan jego zdrowia (Roberfroid, 2007). Suplementacja prebiotykami w przypadku świń może być szczególnie korzystna u zwierząt rosnących w krytycznych okresach odchowu m.in. okresie okołoodsadzeniowym, w którym są one najbardziej podatne na szkodliwe czynniki środowiskowe (Dirkzwager i in., 2005).

Ważną grupę związków w pełni wypełniających założenia, które powinny spełniać prebiotyki są fruktany typu inulinowego (Roberfroid, 2007). Związki te zbudowane są reszt  $\beta$ -D-fruktozy połączonych ze sobą wiązaniami  $\beta(2-1)$  glikozydowymi, co warunkuje ich odporność na hydrolizę w wyniku aktywności enzymów trawiennych gospodarza. Uwzględniając kryterium długości łańcucha polisacharydowego zasadniczo można je podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą cząsteczki zbudowane z 2-8 (średnio 4) reszt fruktozowych nazwane oligofruktanami, zaś cząsteczki o poziomie polimeryzacji powyżej 10 do 60 reszt fruktozowych (średnio 25) klasyfikowane są jako inulina i wchodzi w skład drugiej grupy (Roberfroid, 2005). W zależności od stopnia polimeryzacji fruktanów mogą wywierać odmienne efekty biologiczne. Bogatym, naturalnym źródłem obu grup fruktanów jest korzeń Cykorii podróżnik (*Cichorium intybus*). Mączka otrzymywana z korzeni odmian cykorii hodowanych w Polsce średnio zawiera około 63% inuliny oraz około 2% oligofruktanów (Gałązka, 2002). Ze względu na wysoką zawartość tych związków prebiotycznych susz z korzenia cykorii jest rozważany jako potencjalny suplement w diecie świń. W swoim składzie, poza fruktanami typu inulinowego, zawiera również związki o charakterze antyoksydacyjnym m.in. polifenole (Judžentiene i Budiene, 2008). Ponadto, na szczególną uwagę

zasługuje możliwość bezpośredniego zastosowania suszu z korzenia cykorii jako dodatku paszowego, z pominięciem procesów technologicznych niezbędnych do ekstrakcji fruktanów, co w znacznym stopniu może obniżać koszt suplementacji.

Prebiotyki zawarte w suszu z korzenia cykorii są selektywnie fermentowane w przewodzie pokarmowym świń głównie przez bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Patterson i in., 2010). Wykazano, że fermentacja fruktanów typu inulinowego jest zależna od stopnia ich polimeryzacji oraz poziomu suplementacji. Ponadto, proces ten może być zapoczątkowany w jelicie cienkim świń (Yasuda i in., 2009), choć w głównej mierze zachodzi w jelicie ślepych oraz okrężnicy (Barszcz i in., 2018). W proksymalnych odcinkach przewodu pokarmowego głównym produktem fermentacji inuliny jest kwas mlekowy, zaś w dalszych odcinkach produktami jej fermentacji są przede wszystkim krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe KKT (masłowy, propionowy oraz octowy). Przyczynami obserwowanego zjawiska są zmiany wzajemnego stosunku bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* wzdłuż przewodu pokarmowego świń (Mair i in., 2010). Skutkiem fermentacji bakteryjnej fruktanów jest wzrost populacji bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym (Patterson i in., 2010; Paślack i in., 2015; Barszcz i in., 2018). Efekty fermentacji w jelicie cienkim są stosunkowo słabo poznane, natomiast skutki fermentacji fruktanów w jelicie grubym są dobrze udokumentowane. W związku z efektem bifidogennym, czyli zwiększającą się populacją bakterii probiotycznych, obserwowany jest wzrost kolonizacji przez nie śluzówki jelit oraz zakwaszenie treści pokarmowej produktami fermentacji bakteryjnej, co na zasadzie konkurencji prowadzi do ograniczenia wzrostu bakterii patogennych (Patterson i in., 2010). Ponadto bakterie probiotyczne stymulują sekrecję mucyn przez komórki błony śluzowej jelit (Mack i in., 2017) oraz typowych dla błon śluzowych immunoglobulin A (Xin i in., 2019).

Kolejne efekty są wynikiem działania produktów fermentacji bakteryjnej, które można podzielić na efekty jelitowe oraz ogólnoustrojowe. Do efektów jelitowych, poza faworyzowaniem wzrostu bakterii symbiotycznych i ograniczeniem wzrostu bakterii patogennych, należą indukowane przez KKT zmiany architektury błony śluzowej jelita, manifestowane wydłużeniem kosmków oraz spłyceniem krypt jelitowych (Pierce i in., 2006; Lu i in., 2008; Wen i in., 2012; Diao i in., 2017), co skutkuje wzrostem powierzchni chłonnej błony śluzowej jelita. Kolejnym znanym efektem jest uszczelnienie bariery jelitowej, zachodzącej na drodze zwiększonej sekrecji mucyn 1 oraz 2 (Diao i in., 2017, 2019) stymulowanej przez KKT, a także w wyniku indukcji ekspresji głównych białek tworzących połączenia zamykające: zonuliny-1, okludyny i kładyny-1 oraz 4 w jelicie cienkim, jak i okrężnicy u świń (Diao i in., 2019; Zhang i in., 2019). Obserwuje się również antyapoptotyczny i proliferacyjny wpływ KKT, głównie kwasu masłowego, w stosunku do prawidłowych komórek nabłonka jelitowego (Comalada i in., 2006). Ponadto wykazano, że KKT zwiększają rozpuszczalność oraz stymulują wchłanianie z przewodu pokarmowego, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, jonów dwuwartościowych m.in. poprzez zwiększenie

ich rozpuszczalności (Scholz-Ahrens i Schrezenmeir, 2007) oraz indukcję ekspresji transporterów dla jonów magnezu (Rondón i in., 2008), żelaza (Tako i in., 2008) oraz wapnia (Raschka i Daniel, 2005).

Z puli syntetyzowanych przez bakterie KKT, część absorbowana jest przez kolonocyty, z czego większość kwasu masłowego wykorzystywana jest przez te komórki jako substrat energetyczny, zaś pozostała część transportowana jest do krwi, wraz z którą trafia do wątroby przez żyłę wrotną (Canfora i in., 2015). KKT oddziałują przez swoiste receptory GRP41 oraz GRP43 (obecnie nazywane FFAR3 oraz FFAR2 – ang. Free Fatty Acid Receptors) zarówno na komórki jelit, jak i na komórki narządów peryferycznych w tym wątroby i nerek oraz mięśni szkieletowych, wywierając tym samym szereg efektów o charakterze metabolicznym. KKT stymulując receptory molekularne endokrynych komórek jelitowych-L FFAR3 w jelicie cienkim oraz FFAR2 w okrężnicy wpływają na syntezę hormonów ograniczających łaknienie: jelitowego peptydu Y (PPY) oraz glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) (Nøhr i in., 2013; Diao i in., 2019). Ponadto, wyniki badań wskazują, że kwasy octowy i propionowy oddziałujące przez receptory FFAR2/3 mogą stymulować ekspresję genów zależnych od czynnika transkrypcyjnego PPAR $\alpha$ . Prowadzi to do zwiększenia  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, hamując tym samym depozycję tłuszczu w wątrobie (Kondo i in., 2009; Den Besten i in., 2015). Wykazano również, że mogą one hamować aktywność syntazy kwasów tłuszczowych w tym narządzie (Demigné i in., 1995; Jiao i in., 2018). Część autorów sugeruje również inhibicyjny wpływ KKT na główne enzymy szlaku syntezy cholesterolu (Hara i in., 2018). W przypadku mięśni aktywacja przez propionian oraz octan receptorów GRP43 powoduje nasilenie mitochondrialnej  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, poprzez aktywację kaskad genów zależnych od PPAR $\gamma$ , oraz uwrażliwia komórki mięśni szkieletowych na insulinę, zwiększając tym samym wychwyt glukozy oraz syntezę glikogenu mięśniowego (Canfora i in., 2015). Wydaje się, że uzyskane do tej pory wyniki badań są w dalszym ciągu nie wystarczające do pełnego poznania wpływu prebiotyków, a w szczególności roślin bogatych w inulinę, na funkcjonowanie organizmu zwierząt na poziomie tkanek i narządów. Poznanie tych procesów na poziomie molekularnym jest niezwykle istotne, stąd spotykane w opracowaniach przeglądowych supozycje o konieczności zastosowania podejścia holistycznego z wykorzystaniem narzędzi „-omicznych” do oceny wpływu suplementacji prebiotykami na mikrobiom przewodu pokarmowego oraz organizm gospodarza (Tsurumaki i in., 2015).

### Cel i zakres prac badawczych

Biorąc pod uwagę szerokie spektrum opisanych powyżej efektów oddziaływania zarówno prebiotyków, jak również produktów ich degradacji na organizm zwierząt, **założono hipotezę że, suplementacja diety rosnących świń bogatym w fruktany typu inulinowego suszem z korzenia**



**cykorii wpłynie na przemiany metaboliczne zachodzące na poziomie tkanek, które znajdują odzwierciedlenie w zmianach ekspresji genów obserwowanych na poziomie białek. Weryfikacja tej hipotezy przeprowadzona została w oparciu o badania, których **głównym celem było określenie wpływu suplementacji diety bogatym we fruktany typu inulinowego suszem z korzenia cykorii na proteom surowicy krwi, błony śluzowej jelita krętego oraz wątroby, a także na podstawowe wskaźniki biochemiczne osocza krwi u rosnących świń.****

Realizacja celu głównego była możliwa dzięki sformułowaniu następujących celów szczegółowych:

- identyfikacja możliwości wykorzystania bogatego w fruktany typu inulinowego suszu z korzenia cykorii jako suplementu diety regulującego wskaźniki immunologiczne oraz metaboliczne osocza krwi oraz ocena wpływu tej suplementacji na zmiany relatywnej koncentracji składowych proteomu surowicy krwi (**publikacja I.1**)
- ocena wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na aktywność metaboliczną wątroby analizowaną na poziomie białek (**publikacja I.3**) oraz aktywność enzymów świadczących o funkcji wątroby i innych tkanek peryferycznych oraz status mineralny osocza krwi prosiąt (**publikacja I.2**)
- określenie wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na morfologię jelita krętego, a także ocenę tej suplementacji na procesy zachodzące w enterocytach poprzez analizę ekspresji białek proteomu błony śluzowej jelita krętego (**publikacja I.4**)

### **Omówienie wyników prac wskazanych, jako szczególne osiągnięcie naukowe**

Badania przeprowadzono na mieszańcach PIC x Penarlan P76. Zwierzęta od momentu urodzenia żywione były siarą i mlekiem matek, od drugiego tygodnia życia miały wolny dostęp do paszy stałej, a po odsadzeniu w 28. dniu życia zwierzęta otrzymywały jedynie paszę stałą. Skład paszy był charakterystyczny dla grup badawczych (n=8). Zwierzęta podzielone były na 3 grupy: zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały dietę standardową opartą na zbożach (**I.1; I.2; I.3; I.4**). W przypadku grup doświadczalnych zwierzęta żywiono dietami: suplementowaną 4% suszem z korzenia cykorii (**I.1; I.2; I.3; I.4**) lub 2% dodatkiem inuliny o średnim poziomie polimeryzacji  $\geq 10$  (**I.2; I.3; I.4**). W 50. dniu życia zwierzęta poddano ubojowi i pobrano materiał badawczy. Szczegółowa charakterystyka metod badawczych umożliwiających analizy proteomiczne, jak i badania pozostałych wskaźników biochemicznych wraz z opisem zastosowanych analiz statystycznych otrzymanych rezultatów,

a także szczegółowy opis wyników badań zostały opisane w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe.

W pierwszym etapie zrealizowano badania zawarte w opracowaniu I.1 (**Lepczyński i in., Dietary supplementation with dried chicory root triggers changes in the blood serum proteins engaged in the clotting process and the innate immune response in growing pigs. J Physiol Pharmacol, 2015, 66, 47-55.**) dotyczącym wpływu zastosowania w żywieniu świń 4% dodatku suszu z korzenia cykorii na zmiany relatywnej koncentracji białek będących składowymi proteomu surowicy krwi, a także na wybrane parametry immunologiczne oraz metaboliczne osocza krwi rosnących świń.

Suplementacja diety rosnących prosiąt suszem z korzenia cykorii istotnie wpłynęła na ilościowy skład proteomu surowicy krwi badanych zwierząt. Wspomniane różnice dotyczyły trzech grup białek zaangażowanych w: procesy immunologiczne; metabolizm cholesterolu, a także proces krzepnięcia krwi.

W doświadczeniu wykazano obniżenie ekspresji białek związanych z odpowiedzią ostrej fazy: białka C-reaktywnego (CRP); białka wiążącego komponent dopełniacza C4 (C4BP); komponent dopełniacza C6 (C6) oraz rozpuszczalnej formy białka antygenowego CD14 (sCD14). Ponadto, obserwowano wzrost ekspresji apolipoproteiny A1 (apoA1), która jest negatywnym białkiem ostrej fazy (BOF) u świń (Carpintero i in., 2005). Wyniki te wskazują, że suplementacja diety świń suszem z korzenia cykorii, może wpływać na wyciszenie ekspresji BOF, których koncentracja w wyniku stresu odsadzeniowego, może być podwyższona (Hennig-Pauka i in., 2019). W literaturze dostępne są dane wskazujące na obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych w okrężnicy świń suplementowanych inuliną (Myhill i in., 2018), a także obniżenie koncentracji białek ostrej fazy w wyniku suplementacji synbiotykami wzbogaconymi fruktanami typu inulinowego (ITF) u ludzi (Nova i in., 2011).

Obniżenie koncentracji białek CRP oraz sCD14 może świadczyć o szybszym osiągnięciu funkcjonalnej dojrzałości przewodu pokarmowego w grupie suplementowanych zwierząt. Wykazano bowiem, że koncentracja sCD14 silnie koreluje ze zmianami szczelności bariery jelitowej spowodowanej podażą diety wysokotłuszczowej ubogiej we włókno pokarmowe (Tabung i in., 2017). Ponadto wykazano, że u ludzi osoczowa koncentracja sCD14 (Gori i in., 2011) oraz CRP (Nova i in., 2011) obniża się w wyniku suplementacji diety inuliną lub synbiotykiem wzbogaconym inuliną. W wielu badaniach stwierdzono, że KKT będące produktem fermentacji bakteryjnej ITF wpływają na poprawę integralności nabłonka jelitowego u świń (Myhill i in., 2018; Diao i in., 2019; Zhang i in., 2019). W doświadczeniu opisanym w **publikacji I.4** wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego u zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii również obserwowana była zmiana ekspresji białek związanych z funkcjonalną dojrzałością nabłonka jelitowego oraz pośrednio związanych z jego integralnością.

W doświadczeniu nie zaobserwowano jednak zmian koncentracji immunoglobulin klasy G, M oraz A w osoczu krwi świń suplementowanych suszem z korzenia cykorii, co pozostaje w zgodzie z wynikami doświadczenia przeprowadzonego przez Grełę i in., 2014. Autorzy suplementowali rosnące świnię roślinami inulinodajnymi, w tym 4% suszem z korzenia cykorii, począwszy od 10.-12. do 84. dnia życia. Należy jednak zauważyć, że suplementacja zwierząt 2% wodnym, bądź wodno-alkoholowym ekstraktem inuliny z tych roślin powodowała wzrost koncentracji zarówno IgM oraz IgG u suplementowanych zwierząt, co może wskazywać na wpływ formy suplementacji ITF na indukcję syntezy przeciwciał.

Zwierzęta suplementowane suszem z korzenia cykorii charakteryzowała również wyższa relatywna koncentracja apolipoprotein AI (apoA-I) oraz AIV (apoA-IV), związanych z metabolizmem HDL (Birchbauer i in., 1993). Różnice te nie znalazły jednak odzwierciedlenia w koncentracji cholesterolu całkowitego (TC), a także frakcji cholesterolu związanego z HDL (HDLC) oraz LDL (LDLC). W przypadku zwierząt żywionych dietą z dodatkiem suszu z korzenia cykorii obserwowano niższą, w porównaniu do grupy kontrolnej, relatywną koncentrację apolipoproteiny C-II (apoC-II) oraz TG w osoczu krwi. ApoC-II zaangażowane jest w metabolizm bogatych w trójglicerydy lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) (Andersson i in., 1999), co może wskazywać na ograniczoną syntezę i odkładanie TG w wątrobach suplementowanych zwierząt. Wyniki badań dotyczące wpływu ITF na wskaźniki lipidowe osocza krwi nie są jednak jednoznaczne. Podobne rezultaty obserwowano w przypadku świń suplementowanych 5% dodatkiem inuliny przez okres 60 dni. Autorzy nie obserwowali różnic w koncentracjach TC, HDLC, LDLC oraz trójglicerydów (TG), w porównaniu do zwierząt żywionych dietą kontrolną, nie mniej jednak obserwowano trend do obniżania koncentracji TG u zwierząt suplementowanych (Wu i in., 2016). Otrzymane w doświadczeniu wyniki są również częściowo zbieżne z obserwacjami Greli i in., (2014), którzy analizowali koncentrację TC, HDLC, LDLC oraz TG w 28. oraz 84. dniu życia świń suplementowanych 4% suszem z korzenia cykorii. Autorzy nie zaobserwowali różnic w koncentracji cholesterolu HDLC w obu punktach czasowych oraz TC w 28. dniu życia. Greła i in., (2014) wykazali jednak, istotnie niższą koncentrację TC w 84. dniu oraz LDLC zarówno w 28., jak i 84. dniu życia świń. Ta sama grupa autorów otrzymała podobne wyniki u zwierząt będących w końcowym etapie tuczu (Greła i in., 2014b).

W badaniach wykazano również niższą koncentrację fibrynogenu w osoczu krwi zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii, w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej. Ponadto, u suplementowanych zwierząt obserwowano istotny wzrost ekspresji białek ściśle związanych z układem krzepnięcia tj.: antytrombiny III (ATIII) oraz witronektyny (VT). Fibrynogen jest znanym dodatnim białkiem ostrej fazy u świń (Skovgaard i in., 2009), stąd obniżenie jego koncentracji może być tłumaczone mechanizmem wskazywanym we wcześniejszych akapitach. Ponadto, w badaniach wykazano,

że zastosowanie inuliny w diecie szczurów z indukowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów powodowało obniżenie osoczowej koncentracji fibrynogenu (Abhari i in., 2016). ATIII wraz z trombiną, tworzą osoczowy kompleks TAT (TAT – ang. trombin-antitrombin) formowany w celu wyeliminowania aktywnej trombiny z osocza krwi, połączenie tego kompleksu z witronektyną wiązane jest z mechanizmem usuwania trombiny z krwioobiegu (De Boer i in., 1993). Różnice w osoczowej koncentracji fibrynogenu oraz ATIII i VN pomiędzy zwierzętami suplementowanymi, a świniami z grupy kontrolnej wydają się mieć zbieżny charakter i wskazują, na aktywację procesów ograniczających krzepliwość krwi w wyniku suplementacji diety bogatym w ITF suszem z korzenia cykorii.

W kolejnym doświadczeniu podjęto się analizy wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na poziom ekspresji białek wchodzących w skład proteomu wątroby **I.2 (Lepczyński i in., 2017, Dietary chicory root and chicory inulin trigger changes in energetic metabolism, stress prevention and cytoskeletal proteins in the of growing pigs – a proteomic study, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 101, e225-e236)**. Wynika to z faktu, że w wątrobie syntetyzowane są białka ostrej fazy, jak i wiele innych białek osoczowych, których ekspresja u zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii była istotnie różna w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej w doświadczeniu opisywanym w publikacji (I.1), a także ze względu na doniesienia wskazujące na modyfikacje wątrobowego metabolizmu energetycznego poprzez KKT (den Besten i in., 2013), lub w wyniku suplementacji diety inuliną lub cykorią (Kim i Shin, 1998).

Zgodnie z założoną hipotezą w doświadczeniu zaobserwowano istotne różnice ekspresji białek wynikające z zastosowania diet wzbogaconych ITF w postaci 2% wyciągu inulinowego z cykorii (IN) oraz 4% suszu z korzenia cykorii (CR). Główne grupy białek o istotnie zróżnicowanej ekspresji związane były z metabolizmem energetycznym, stresem oksydacyjnym oraz organizacją cytoszkieletu.

Wśród produktów genowych zaangażowanych w metabolizm energetyczny wyróżnić można białka biorące udział w syntezie i metabolizmie cholesterolu, metabolizmie pozostałych lipidów w tym TG, a także metabolizmie glukozy. Szczególnie istotne wydają się białka zaangażowane w metabolizm cholesterolu do których należą: kinaza mewalonatu (MVK) oraz apoA1. Silny związek z tymi produktami genowymi ma białko związane z syntezą pierwotnych kwasów żółciowych N-acylotransferaza kwasów żółciowych-CoA:aminokwas (BAAT). Ekspresja wyżej wspomnianych białek była istotnie wyższa u zwierząt żywionych dietą z dodatkiem suszu z korzenia cykorii. Dotychczas wskazywanym mechanizmem odpowiedzialnym za obniżenie osoczowej koncentracji cholesterolu w osoczu krwi w wyniku suplementacji diety włóknem pokarmowym był hamujący wpływ KKT na aktywność enzymów odpowiedzialnych za powstawanie prekursorów cholesterolu w wątrobie, głównie reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (Lin i in., 1995), katalizującej powstawanie kwasu

mewalonowego, będącego bezpośrednim substratem dla reakcji katalizowanej przez MVK. W świetle otrzymanych wyników badań, w których wątrobowa ekspresja MVK jest wyższa w wyniku suplementacji diety CR, mechanizm ten u zdrowych rosnących świń wydaje się być odmienny. Potwierdzają go nieopublikowane wyniki własne, w których obserwujemy istotny wzrost koncentracji cholesterolu w wątrobach zwierząt obu grup doświadczalnych, suplementowanych ITF oraz suszem z korzenia cykorii. Wzrost ekspresji MVK i BAAT oraz jednoczesny brak istotnych różnic w osoczowej koncentracji TC, HDL, LDL obserwowany we wcześniejszych doświadczeniach własnych (I.1 – Lepczyński i in., 2015) mogą wskazywać na wzrost syntezy pierwotnych kwasów żółciowych w wątrobie z ich prekursora cholesterolu. Może to być odpowiedź na obserwowane w innych doświadczeniach ograniczenie wchłaniania cholesterolu i kwasów żółciowych (BA) z przewodu pokarmowego jako jednego z efektów suplementacji diety ITF (De Rodas i in., 1996). Koncepcję tą potwierdzają wyniki badań prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych, w których obserwowano wzrost wydalania wraz z kałem BA (Trautwein i Erbersdobler, 1998; Parnell i Reimer, 2010) oraz BA i cholesterolu (Kim i Shin, 2018) u zwierząt suplementowanych ITF lub cykorią. Ponadto, Parnell i Reimer (2010) poza zwiększonym wydalaniem BA u zwierząt żywionych paszą z dodatkiem inuliny wykazali wzrost ekspresji genów dla syntetazy HMG-CoA oraz odpowiedzialnej za syntezę pierwotnych kwasów żółciowych wątrobowej 7 $\alpha$ -hydroksylazy cholesterolowej, co skorelowane było dodatnio z poziomem suplementacji ITF. Wzrost ekspresji genu MVK wykazano również w wyniku inkubacji hepatocytów w medium zawierającym kwas propionowy, który jest jednym z głównych produktów jelitowej fermentacji inuliny metabolizowanym w wątrobie (den Besten i in., 2013).

Kolejną grupą białek, których wątrobowa ekspresja uległa zmianie w wyniku suplementacji diety 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii i/lub 2% dodatkiem inuliny, związana była z metabolizmem kwasów tłuszczowych i cukrów prostych. Pierwszym z nich była kinaza adenozynowa (ADK), której ekspresja wzrastała w przypadku obu diet eksperymentalnych, białko to odpowiada za konwersję ATP do AMP regulując jego komórkową koncentrację (Boison i in., 2002). Wewnątrzkomórkowy wzrost koncentracji AMP, niesie ze sobą szereg konsekwencji m.in. jest regulatorem fosforylacji kinazy zależnej od AMP (AMPK) w wątrobie (Hardie, 2004). Należy zauważyć, że zarówno wzrost koncentracji AMP, jak i aktywności AMPK obserwuje się w hepatocytach pod wpływem KKT (Kondo i in., 2009; Li i in., 2013). Mechanizm regulacji przemian metabolicznych w komórce pod wpływem AMPK zachodzi za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego - PPAR $\alpha$ , którego geny docelowe zaangażowane są w zwiększenie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, syntezę glikogenu oraz uwrażliwienie komórek na insulinę (Canfora i in., 2015). Produktami genów zależnych od PPAR $\alpha$ , których ekspresja w wątrobie była istotnie wyższa w wyniku suplementacji świń ITF są m.in.: apoA-I, (wątrobowa karboksylesteraza 1) CES1 oraz (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego 1) GPD1 (Rakhshandehroo i in., 2010).

W wyniku suplementacji diety inuliną oraz dodatkiem suszu z korzenia cykorii obserwowano istotny wzrost ekspresji CES1. Białko to ma znaczny udział w regulacji metabolizmu lipidów m.in. poprzez swoją zdolność do hydrolizy trójglicerydów (Alam i in., 2002). Wykazano, że wzrost aktywności CES1 w wątrobach myszy, powoduje obniżenie wątrobowej akumulacji TG, a także obniżenie ich koncentracji w osoczu krwi (Xu i in., 2014). Obniżoną akumulację TG w wątrobie i osoczu krwi w wyniku suplementacji diety oligofruktozą oraz długołańcuchową inuliną wykazano również na modelu szczurzym (Rault-Nania i in., 2008). Można więc przypuszczać, że poprzez indukcję ekspresji CES1 w wyniku stosowania diet eksperymentalnych, może dochodzić do regulacji koncentracji TG w osoczu krwi, czego efektem może być wcześniej omawiane istotnie niższe osoczowe ich stężenie w osoczu krwi świń suplementowanych 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii (**publikacja I.1**).

Kolejnym białkiem zależnym od aktywności PPAR $\alpha$ , którego ekspresja była istotnie wyższa w grupie zwierząt suplementowanych CR, był enzym związany z metabolizmem glukozy GPD1. Jednym z efektów wywieranym przez sole kwasu propionowego w wątrobie jest proces glukoneogenezy (Canfora i wsp., 2015). Dlatego też, nasilona glukoneogeneza wydaje się być możliwą przyczyną obserwowanej wyższej ekspresji GPD1 u suplementowanych świń. Wysoką ekspresję tego białka obserwowano również u świń suplementowanych L-karnityną, związkami stymulującym  $\beta$ -oksydację kwasów tłuszczowych, co częściowo może potwierdzać tę teorię (Keller i in., 2011). Nie mniej jednak, należy zauważyć, że w odpowiedzi na inkubację komórek linii PC12 z propionianem i maślanem obserwowano obniżenie ekspresji genu *GPD1* (Nankova i in., 2014).

Zwierzęta spożywające obie diety z dodatkiem ITF charakteryzowała wyższa wątrobowa ekspresja białek związanych bezpośrednio lub pośrednio z procesami antyoksydacyjnymi SOD1 (dysmutaza ponadtlenkowa 1), PRDX5 (peroksyredoksyna 5), PRDX6 (peroksyredoksyna 6), GSTO1 (S-transferaza glutationowa omega 1), SELENBP1 (białko wiążące selen 1). Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku zwierząt otrzymujących dodatek pod postacią suszu z korzenia cykorii różnice te były bardziej spektakularne. Antyoksydacyjne właściwości fruktanów typu inulinowego zostały niejednokrotnie potwierdzone (Ahmed, 2009; Saggu i in., 2014; Franco-Robles i López, 2015; Nwafor i in., 2017). Ponadto korzeń cykorii, poza wysoką zawartością ITF jest bogatym źródłem polifenoli o silnych właściwościach antyoksydacyjnych (Nwafor i in., 2017), co może tłumaczyć wyższą ekspresję białek zaangażowanych w ochronę przed stresem oksydacyjnym u zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii. W badaniach przeprowadzonych przez Żary-Sikorską i Juśkiewicz (2008) jednoznacznie udowodniono, że suplementacja loch inuliną zwiększyła pojemność antyoksydacyjną osocza krwi mierzoną aktywnością SOD oraz peroksydazy glutationowej (GSH-Px). W przypadku szczurów żywionych dietą wysokotłuszczową z dodatkiem inuliny (5%), wykazano wyższą w stosunku do zwierząt żywionych dietą bez dodatku ITF aktywność SOD oraz katalazy w wątrobie (Wu i Chen,

2011). Podobne zależności zaobserwowano w przypadku szczurów żywionych przez 8 tygodni dietą z 10% udziałem suszu z cykorii (Hassan i Yousef, 2010). Kolejnymi białkami o istotnie wyższej ekspresji w wątrobach zwierząt żywionych dietami eksperymentalnymi były PRDX5 oraz PRDX6. Wykazano związek pomiędzy aktywnością tych białek, a prewencją zaburzeń metabolizmu lipidów, cholesterolu oraz kwasów żółciowych (Vona i in., 2019). Wątrobowe peroksyredoksyny, a w szczególności PRDX6, wskazywane są jako białka o charakterze cytoprotekcyjnym, ściśle związanym z ich aktywnością antyoksydacyjną (Manevich i in., 2002). Białka z tej grupy odpowiadają za redukcję nadtlenu wodoru powstającego m.in. w procesie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych (Rhee i in., 2001). Wydaje się więc, że ukierunkowanie metabolizmu komórkowego na  $\beta$ -oksydację kwasów tłuszczowych przez KKT (Canfora i in., 2015, 2017), może być przyczyną wzrostu ich ekspresji, jako mechanizm prewencji przed stresem oksydacyjnym. Wysoka ekspresja SELENBP1 obserwowana była w wątrobach zwierząt żywionych obiema dietami eksperymentalnymi. Fizjologiczna rola tego białka nie została w pełni poznana, choć potwierdzono jego udział w regulacji procesów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych (Fang i in., 2010). Sugeruje się również jego rolę w regulacji podziałów komórkowych (Giometti i in., 2000), a także metabolizmie lipidów (Park i in., 2004). Nie wykazano bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją SELENBP1, a statusem selenu w tkankach (Elhodaky i Diamond, 2018). Nie mniej jednak, wykazano zdolność do wbudowywania selenu pochodzącego z diety w to białko, co nie wyklucza takiej zależności (Chang i in., 1997). Jest to ciekawe zwłaszcza w kontekście zwiększania biodostępności selenu poprzez stosowanie fortyfikowanych nim probiotyków (Kurek i in., 2016). Różnice w ekspresji białek zaangażowanych w ochronę przed stresem oksydacyjnym można rozpatrywać również przez pryzmat okresu okołoodsadzeniowego. W okresie tym, dochodzi do szeregu zmian w wątrobie prosiąt. Związane są one z indukcją stresu oksydacyjnego, co manifestowane jest m.in. obniżeniem aktywności SOD oraz GSH-Px w wątrobie. Konsekwencją stresu oksydacyjnego, może być także apoptoza części hepatocytów (Luo i in., 2016). Wydaje się, że zastosowanie w diecie dodatku suszu z korzenia cykorii stymulujące ekspresję białek związanych z prewencją stresu oksydacyjnego może świadczyć o efektywniejszym redukowaniu stresu wynikającego z odsadzenia u badanych prosiąt. W ten sam sposób można tłumaczyć różnice w ekspresji białek cytoszkieletarnych.

W wyniku zastosowaniu w diecie dodatku zarówno suszu z korzenia cykorii, jak i fruktanów typu inulinowego obserwowano obniżoną w stosunku do grupy kontrolnej ekspresję białek cytoszkieletu hepatocytów. Różnice te dotyczyły białek wchodzących w skład filamentów pośrednich, filamentów cienkich i ich białek towarzyszących, a także mikrotubul. Funkcja cytoszkieletu w komórkach wątroby jest niezwykle złożona i wiąże się z utrzymaniem kształtu komórek, transportem wewnątrzkomórkowym, odpowiedzią na sygnały zewnątrzkomórkowe oraz aktywnością metaboliczną. Ponadto, reorganizacja cytoszkieletu w przypadku hepatocytów często związana jest ze stresem komórkowym i zmienia się wraz

z przebiegiem chorób, w tym schorzeń o charakterze metabolicznym (Doctor i Nichols, 2004; Strnad i in., 2008). Wśród wymienionych grup białek szczególną uwagę zwraca obniżona w wyniku suplementacji diety ITF oraz suszem z korzenia cykorii ekspresja cytokeratyny 18 (CK18). CK18 wraz z CK8 są białkami wchodzącymi w skład filamentów pośrednich, typowych dla hepatocytów (Omary i in., 2002). Uznaje się, że CK18 należy do wewnątrzkomórkowych białek ostrej fazy, a wzrost jej ekspresji obserwuje się w wyniku stymulacji hepatocytów IL-6 (Guldiken i in., 2015). Nadekspresja KRT18 jest charakterystyczna dla stanów zapalnych wątroby, jak i chorób metabolicznych takich jak NAFLD (Rodríguez-Suárez i in., 2010; Guldiken i in., 2015), wykazano również indukcję ekspresji tego białka w wyniku stosowania diety wysokotłuszczowej (Park et al., 2004). Fruktany typu inulinowego, suplementowane w formie wyciągów i/lub w formie naturalnej pod postacią suszu z roślin inulinodajnych, wykazują działanie hepatoprotekcyjne (Samolińska i in., 2019), stąd można przypuszczać, że obniżona ekspresja CK18 może być przejawem przeciwwzapalnego i protekcyjnego wpływu suplementowanych diet na ten organ.

Analiza proteomu wątroby wykazała istotny wpływ suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na funkcję tego organu w szczególności metabolizm energetyczny, a także na aktywację mechanizmów związanych z zapobieganiem jego uszkodzeniu m.in. w wyniku stresu oksydacyjnego, czy też innych czynników stymulujących stan zapalny. Dlatego też, kolejne badania zawarte w publikacji **I.3 (Lepczyński i in., 2016, Inulin-type fructans trigger changes in iron concentration and activity of bone metabolism biomarkers in blood plasma of growing pigs, Journal of Animal and Feed Sciences, 25, 343-347.)** koncentrowały się na analizie wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii oraz natywną inuliną na wskaźniki czynności wątroby, wraz z panelem enzymów odzwierciedlających funkcjonowanie innych tkanek i narządów peryferycznych. Ponadto, oszacowano wpływ suplementacji ITF na osoczowy status wybranych makro- i mikroelementów.

Analiza panelu osoczowych wskaźników odzwierciedlających czynność wątroby, wykazała istotne różnice pomiędzy zwierzętami żywionymi dietą kontrolną oraz suplementowanymi 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii. W osoczu zwierząt żywionych dietą z dodatkiem suszu z korzenia cykorii obserwowano istotnie wyższą koncentrację osoczowej albuminy, która jest wskaźnikiem utrzymania funkcji wydzielniczej wątroby, odzwierciedlającym również stan odżywienia zwierząt (Kang, 2013). Jedną z przyczyn wyższego stężenia albuminy w osoczu krwi zwierząt suplementowanych może być aktywność bakterii symbiotycznych. Wykazano, bowiem wpływ stosowania dodatku probiotycznego w diecie świń na ogólne natężenie syntezy białek w wątrobie, manifestowane m.in. wyższą syntezą albumin (Harding i in., 2008). Ponadto, brak różnic w koncentracji białka całkowitego oraz bilirubiny pomiędzy grupami badawczymi wskazują na prawidłową funkcję wątroby w przypadku zwierząt



żywionych dietami eksperymentalnymi. Analizy aktywności profilu enzymów w osoczu krwi, wykazała istotnie wyższą aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz fosfatazy alkalicznej (ALP), a także niższą aktywność gamma glutamylotransferazy (GGT) w przypadku zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w susz z korzenia cykorii. Należy nadmienić, że mimo wyższej aktywności ALT w grupie zwierząt żywionych suszem z korzenia cykorii pozostawała ona w zakresie referencyjnym dla 6-tygodniowych świń (Cooper i in., 2014). Wysoka aktywność ALP, wydaje się mieć inne aniżeli wątrobowe pochodzenie. Należy pamiętać, że w osoczu występują dwie główne izoformy ALP tj. wątrobowa oraz kostna. Wysoką aktywność tego enzymu w osoczu krwi obserwuje się w trakcie mineralizacji kośćca (Singer i Eyre, 2008; Greenblatt i in., 2017). Tymczyna i in. (2012) wskazują ALP jako potencjalny wskaźnik anabolizmu tkanki kostnej u rosnących świń. Ponadto, do 90% osoczowej aktywności ALP u dzieci w okresie intensywnego wzrostu przypisywana jest izoenzymom pochodzenia kostnego (Van Hoof i in., 1990). Potwierdzeniem przypuszczenia, że obserwowana wysoka aktywność ALP w grupie zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii może być wynikiem mineralizacji kości, jest istotnie niższa aktywność GGT w osoczu krwi tych zwierząt. Według Kang (2013) wzrost aktywności ALP w osoczu krwi, bez istotnego wzrostu aktywności GGT, wskazuje na aktywność frakcji kostnej tego enzymu. Do utrzymania prawidłowego wzrostu kośćca niezbędne jest również odpowiednio wysokie stężenie jonów wapnia. W przypadku zwierząt otrzymujących diety suplementowane zarówno inuliną, jak i suszem z korzenia cykorii obserwowano trend statystyczny ( $P=0,052$ ) do wzrostu koncentracji tego pierwiastka w osoczu krwi. Mechanizm związany ze wzrostem wchłaniania wapnia z przewodu pokarmowego polega na zwiększeniu powierzchni absorpcyjnej będącej wynikiem działania kwasu masłowego, aktywacji transporterów komórkowych dla wapnia w wyniku działania KKT, a także wyższej rozpuszczalności wapnia w kwaśnym  $pH$  treści jelitowej. Ponadto, metabolity bakteryjne m.in. serotonina mogą stymulować aktywność metaboliczną kości, co obszernie opisano w artykule przeglądowym autorstwa Whisner i Castillo (2018).

Zastosowanie suszu z korzenia cykorii jako suplementu diety wpłynęło na wzrost koncentracji żelaza w osoczu krwi prosiąt. W badaniach na świniami potwierdzono zwiększenie biodostępności żelaza u świń suplementowanych inuliną niezależnie od długości jej łańcucha (Tako i in., 2008; Yasuda i in., 2009), choć efekt ten uzależniony jest od poziomu suplementacji (Yasuda i in., 2006). Potwierdzono również skuteczność suplementacji ITF w postaci suszu z roślin inulinodajnych na statusu tego biopierwiastka w osoczu krwi rosnących świń (Samolińska i in., 2019). Za wzrost wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego odpowiada szereg mechanizmów. Dla przykładu Yasuda i in. (2006) zaobserwowali wyższe stężenia rozpuszczalnych form żelaza w proksymalnym, środkowym i dystalnym segmencie okrężnicy, natomiast Tako i in. (2008) oraz Yasuda i in. (2009) wykazali wzrost ekspresji (zarówno na poziomie genu, jak i białka) dla transporterów żelaza, błonowych receptorów dla tych

transporterów, jak i białek zaangażowanych w magazynowanie żelaza zarówno w jelicie cienkim, jak i grubym świń. Wyższą relatywną koncentrację transferryny zaobserwowano w błonie śluzowej jelita krętego świń suplementowanych suszem z korzenia cykorii w badaniach własnych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**publikacja I.4** – Lepczyński i in., 2019). Ze względu na indukcję ekspresji transporterów dla żelaza w dwunastnicy, jak i w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego Tako i in. (2008) zakładają, że zarówno cząsteczki inuliny, jak i produkty jej fermentacji mogą odpowiadać za stymulowanie wchłaniania żelaza w przewodzie pokarmowym świń.

Uwzględniając informacje o fermentacji inuliny w dystalnych odcinkach jelita cienkiego świń (Böhmer i in., 2005; Yasuda i in., 2009) oraz mając na względzie brak doniesień na temat procesów zachodzących w enterocytach w wyniku suplementacji diety świń ITF, w kolejnym doświadczeniu zaplanowana została analiza proteomu błony śluzowej jelita krętego (**IV.B4, Lepczyński i in., 2019, Modification of ileal proteome in growing pigs by dietary supplementation with inulin or dried chicory root, Journal of Animal and Feed Sciences, 28, 177–186**).

Analiza profili białkowych błony śluzowej jelita krętego wykazała istotne różnice wynikające z suplementacji diety świń ITF zarówno w formie natywnej inuliny, jak i suszu z korzenia cykorii. Główne różnice obserwowano w przypadku białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny, proces proliferacji komórek, a także organizacji cytoszkieletu komórkowego. Ponadto, obserwowano różnice w relatywnej koncentracji (TfR), białka związanego ze statusem żelaza w organizmie świń.

W badaniach zaobserwowano zmiany ekspresji białek związanych z procesami glikolizy/glukoneogenezy i metabolizmem aminokwasów pod wpływem diet suplementowanych 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii. Ze względu na ograniczone informacje dotyczące wpływu ITF na metabolizm enterocytów zasadne wydaje się porównanie otrzymanych wyników z rezultatami otrzymanymi w badaniach wykorzystujących model *in-vitro* bazujący na komórkach Caco-2, które po odpowiedniej inkubacji mogą stanowić model odzwierciedlający metabolizm komórek jelita cienkiego (Lamers i in., 2003; Chang i in., 2008). Lamers i in. (2003) wykazali, że w wyniku inkubacji komórek Caco-2 w medium z dodatkiem inuliny lub KKT znacząco zmienia się profil metabolitów, będący odzwierciedleniem aktywności enzymatycznej białek. Pod wpływem natywnej inuliny, w komórkach wzrastała koncentracja glukozy, glutaminianu oraz alaniny. Szczególnie interesującym wydaje się wzrost syntezy glutaminianu, z uwagi na fakt że związek ten ma wpływ na utrzymanie integralności bariery jelitowej, szczególnie w przypadku reorganizacji nabłonka jelitowego w wyniku stresu m.in. odsadzeniowego, a także wiązany jest ze wzrostem wchłaniania jonów z przewodu pokarmowego (Wang i in., 2015). Inkubacja komórek Caco-2 w medium z KKT, ukierunkowywała metabolizm komórek

na szlak glikolizy, na co wskazuje metaboliczny odcisk palca o wysokiej koncentracji bursztynianu, mleczanu oraz kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego. Ponadto, na profil metaboliczny składały się aminokwasy (alanina oraz prolina) i ich prekursorzy tj. nikotynian i amid kwasu nikotynowego (Lamers i in., 2003). Efekt ten potwierdzono również na poziomie transkryptomu (Chang i in., 2008). W wyniku inkubacji komórek Caco-2 w medium z KKT wykazano wzrost ekspresji genów dla enzymów szlaku glikolitycznego (Chang i in., 2008). Wang i in. (2012) wykazali możliwość modulowania ekspresji enzymów szlaku glikolitycznego na poziomie białek w błonie śluzowej jelita czczego w wyniku suplementacji diety świń probiotykiem *Lactobacillus fermentum* I5007. W przypadku przeprowadzonych badań istotna wydaje się wysoka ekspresja izomerazy tri-fosforanowej 1 oraz dehydrogenazy izocytrynianowej 1 u zwierząt otrzymujących paszę z dodatkiem suszu z korzenia cykorii. W badaniach Chang i in. (2008) wykazano około dwukrotnie wyższą ekspresję tych białek w kosmkach jelitowych, w porównaniu do krypt, co autorzy wiążą z funkcjonalną dojrzałością błony śluzowej jelita świń. Można więc wnioskować, że wzrost ekspresji białek zaangażowanych w proces glikolizy w wyniku suplementacji diety suszem z korzenia cykorii może wynikać przede wszystkim z fermentacji ITF, zachodzącej już w dystalnych odcinkach jelita cienkiego, i oddziaływania KKT na komórki błony śluzowej jelita, jednocześnie odzwierciedlając zmiany związane z funkcjonalnym dojrzewaniem nabłonka jelitowego.

Powyższe znajduje również potwierdzenie w zmianach ekspresji markerów proliferacyjnych w komórkach nabłonka jelitowego, a także białek zaangażowanych w organizację cytoszkieletu komórkowego. Do pierwszej grupy należą jądrowy antygen komórek proliferujących (PCNA) oraz kontrolowane translacyjnie białko nowotworowe (TCTP), białka związane z regulacją proliferacji i różnicowaniem komórek nabłonka jelitowego, których istotnie niższe ekspresje obserwowano w błonie śluzowej jelita krętego świń suplementowanych suszem z korzenia cykorii. PCNA jest białkiem charakterystycznym dla proliferujących komórek w fazie G1/S cyklu komórkowego (Paunesku i in., 2001; Strzalka i Ziemięnowicz, 2011). W badaniach Rekiel i in. (2010a; b) wykazano, że dodatki paszowe mogą wpływać na dynamikę proliferacji komórek jelita cienkiego, a tym samym jego dojrzałość funkcjonalną. Autorzy wykazali, że w wyniku suplementacji świń pro- i prebiotykami aktywność proliferacyjna komórek krypt jelitowych jest istotnie niższa, co manifestowało się m.in. obniżoną ilością komórek błony śluzowej jelita krętego wykazujących ekspresję PCNA. TCTP to białko zaangażowane w kontrolę prawidłowości przebiegu cyklu komórkowego, którego ekspresja indukowana jest stresem m.in. oksydacyjnym (Bommer, 2012). Należy również zwrócić uwagę na silną polaryzację ekspresji tego białka w osi krypty:kosmki jelitowe, co wynika z wysokiej proliferacyjnej aktywności krypt jelitowych (Sheverdin i in., 2013). Wysoka aktywność proliferacyjna krypt jest związana z przebudową nabłonka jelitowego m.in. w wyniku stresu odsadzeniowego (Masri i in., 2015). W przeprowadzonych badaniach nie obserwowano różnic histologicznych pomiędzy zwierzętami żywionymi dietami eksperymentalnymi

i dietą kontrolną, nie mniej jednak wykazano trend do spłykania krypt jelitowych w przypadku zwierząt żywionych dietą z dodatkiem suszu z korzenia cykorii. Wydaje się więc, że niska ekspresja obu białek świadczy o większej dojrzałości funkcjonalnej nabłonka jelitowego. Masri i in. (2015) wskazują, że w ocenie dojrzałości błony śluzowej jelita cienkiego należy zwrócić uwagę nie jedynie na parametry morfologiczne, a również na molekularne wskaźniki tej dojrzałości, do których można zaliczyć profil ekspresji białek. Przypuszczenia te zdaje się potwierdzać wysoka ekspresja białek cytoszkieletu w grupie zwierząt żywionych obiema paszami eksperymentalnymi. Pierwszym z nich jest cytokeratyna 20 (KRT20), która wykazuje silną polaryzację w osi krypty:kosmki jelitowe z przewagą ekspresji w dojrzałych fenotypowo komórkach kosmków, będąc jednocześnie markerem w pełni zróżnicowanych enterocytów o fenotypie absorbcyjnym (Wang i in., 2017). Ponadto, jednym z czynników stymulujących różnicowanie komórek nabłonka jelitowego są KKT, głównie kwas masłowy (Chang i in., 2008). Wysoką ekspresję KRT20 w błonie śluzowej jelita cienkiego odnotowano również u kurcząt broilerów suplementowanych probiotykiem (Luo i in., 2013).

Ponadto, w przeprowadzonym doświadczeniu w grupie zwierząt żywionych suszem z korzenia cykorii obserwowano wzrost ekspresji białek związanych z cytoszkieletem aktynowym, zaangażowanych w utrzymanie integralności i szczelności bariery jelitowej. Wielokrotnie został potwierdzony pozytywny wpływ suplementacji diety ITF na uszczelnianie bariery jelitowej poprzez wzrost ekspresji białek formujących połączenia zwierające (Diao i in., 2017; Wu i in., 2017). W przypadku prezentowanego doświadczenia obserwowano zmiany ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie stabilności i formowania tych połączeń. Należą do nich białko spokrewnione z aktyną 3 (ACTR3) oraz aneksyna 2 (ANXA2). ACTR3 jest białkiem kluczowym dla utrzymania i formowania połączeń zwierających nabłonka jelitowego (Bernadskaya i in., 2011). Stymulację jego ekspresji wraz z innymi białkami połączeń zwierających pod wpływem inuliny i fruktooligosacharydów zaobserwował na modelu *in vitro* Johnson-Henry i in. (2014). ANXA2 jest białkiem o szeregu istotnych funkcji związanych z utrzymaniem funkcjonowania komórek nabłonka jelitowego. Wskazywana jest między innymi jako białko zaangażowane w utrzymanie integralności połączeń zamykających (Lee i in., 2004). Na wzrost szczelności bariery jelitowej wskazuje również spadek relatywnej koncentracji sCD14 w osoczu krwi prosiąt suplementowanych suszem z korzenia cykorii (publikacja **I.1 – Lepczyński et al., 2015**), które jest białkowym markerem integralności bariery jelitowej. Ponadto ANXA2 związana jest z ochroną komórek przed stresem oksydacyjnym głównie wywołwanym przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, co wynika z możliwości oksydacji jej reszt cysteinowych (Madureira i in., 2011). Antyoksydacyjny wpływ ITF oraz produktów ich fermentacji był już wcześniej wskazywany, a w przypadku suplementacji roślinami inulinodajnymi, potwierdzony także w badaniach własnych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (publikacja **I.3 – Lepczyński et al., 2017**). W opracowaniu tym wykazano indukcję ekspresji białek związanych

z ochroną przed stresem oksydacyjnym w wątrobie prosiąt suplementowanych suszem z korzenia cykorii. Białko to jest również związane z polaryzacją komórek rąbka szczoteczkowego jelita poprzez udział w transporcie do błony szczytowej wielu hydrolaz zaangażowanych w trawienie przyścienne (Hein i in., 2011). Wzrost ekspresji ANXA2 oraz KRT20 można wiązać zatem z wyższą dojrzałością funkcjonalną nabłonka jelitowego świń suplementowanych suszem z korzenia cykorii.

Suplementacja diety suszem z korzenia cykorii spowodowała również wzrost koncentracji transferryny w komórkach błony śluzowej jelita krętego świń. Białko to nie ulega ekspresji w jelicie cienkim (Idzerda i in., 2006), nie mniej jednak może być transportowane do wnętrza enterocytów na drodze endocytozy receptorowej z wykorzystaniem receptora dla transferryny (Morgan i Oates, 2002). Ekspresja receptora dla transferryny na powierzchni komórek nabłonka jelitowego odzwierciedla status żelaza w organizmie świń i jest odwrotnie skorelowana z koncentracją żelaza w osoczu świń (Kolachala i in., 2007). Jak już wcześniej omawiano niezależnie od statusu żelaza Tako i in. (2008) wykazali wzrost ekspresji białek związanych z obrotem żelaza w przewodzie pokarmowym w tym TfR w jelicie cienkim świń suplementowanych inuliną. Wzrost relatywnej koncentracji transferryny obserwowany w prezentowanym doświadczeniu oraz niemal dwukrotnie wyższa koncentracja żelaza w osoczu krwi zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii (publikacja **I.2 – Lepczyński i in., 2016**) mogą świadczyć o wpływie substancji bioaktywnych zawartych w suszu z korzenia cykorii na stymulację mechanizmów odpowiedzialnych za wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego świń już w jelicie cienkim.

## Podsumowanie

Dodatek do diety prosiąt bogatego w fruktany typu inulinowego suszu z korzenia cykorii wpłynął na wzrost koncentracji żelaza w osoczu krwi rosnących świń (**I.2**). Dodatkowo można stwierdzić wpływ tego dodatku na zmiany relatywnej koncentracji transferryny w błonie śluzowej jelita krętego, co może wskazywać na możliwość aktywacji mechanizmów związanych z wchłanianiem żelaza w jelicie cienkim przez zawarte w suszu z korzenia cykorii związki bioaktywne (**I.4**).

Dodatek do diety świń suszu z korzenia cykorii powoduje wzrost aktywności ALP w osoczu krwi, co przy jednoczesnej wyższej koncentracji wapnia w osoczu krwi może świadczyć o kościotwórczym wpływie bioaktywnych składników zawartych w korzeniu cykorii (**I.2**).

Włączenie dodatku suszu z korzenia cykorii do żywienia świń w okresie około odsadzeniowym nie ma negatywnego wpływu na osoczkową aktywność enzymów profilu wątrobowego, a także nie zaburza funkcji wątroby, co manifestowane jest poprzez stabilną koncentrację białka ogólnego, a także wyższą w porównaniu do diety kontrolnej koncentrację albuminy w osoczu krwi (**I.2**). Ponadto, dodatek ten wpływa

na obniżenie ekspresji CK18, uznanej za wątrobowe białko ostrej fazy. Powyższe wskazuje na możliwość bezpiecznego stosowania tego dodatku paszowego w żywieniu rosnących świń (I.3).

Dodatek do diety suszu z korzenia cykorii spowodował obniżenie relatywnej koncentracji białek ostrej fazy w osoczu krwi prosiąt (CRP; C4BP; składnik dopełniacza C6; antygen CD14) co jednoznacznie wskazuje na jego wpływ przeciwzapalny. Ponadto w wyniku suplementacji zaobserwowano obniżenie koncentracji fibrynogenu w osoczu krwi, jak również wzrost relatywnej koncentracji antytrombiny III oraz witronektyny białek zaangażowanych w eliminację z krwi trombiny, co może świadczyć o aktywacji mechanizmów ograniczających krzepliwość krwi w wyniku suplementacji diety bogatym w ITF suszem z korzenia cykorii (I.1).

Zastosowanie w diecie świń suszu z korzenia cykorii powoduje wzrost ekspresji białek zaangażowanych w ochronę przed stresem oksydacyjnym w wątrobie (PRDX6; PRDX5; SOD1; SELENBP1) (I.3) oraz w błonie śluzowej jelita krętego (ANXA2) (I.4), co świadczy o antyoksydacyjnym potencjale tego suplementu diety.

Zaobserwowano, że dodatek suszu z korzenia cykorii wpłynął na obniżenie koncentracji TG w osoczu krwi prosiąt oraz relatywnej koncentracji apoC-II związanej z transportem bogatej w TG frakcji cholesterolu VLDL, jednocześnie nie wpływając istotnie na osoczową koncentrację cholesterolu całkowitego i jego poszczególnych analizowanych frakcji (HDLc; LDLc) (I.1). Mimo tego, obserwowano wzrost ekspresji białek zaangażowanych w syntezę cholesterolu (MVK) w wątrobie suplementowanych prosiąt, przy jednoczesnym wzroście ekspresji białek związanych z sekrecją pierwotnych kwasów żółciowych (BAAT), co może świadczyć o utrzymaniu syntezy cholesterolu w tym narządzie i jego konwersji do pierwotnych kwasów żółciowych, w celu uzupełnienia ich puli prawdopodobnie wydalonej wraz z kałem (I.3).

W doświadczeniu wykazano modulujący wpływ składników bioaktywnych zawartych w suszu z korzenia cykorii na wskaźniki związane z metabolizmem energetycznym, wskazując na prawdopodobne ukierunkowanie metabolizmu podstawowego w wątrobie na szlak  $\beta$ -oksydacji (I.3) oraz w błonie śluzowej jelita krętego na szlak glikolizy (I.4).

Wykazano również wpływ suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na zmiany ekspresji białek związanych z funkcjonalną dojrzałością nabłonka jelitowego (KRT20, PCNA, TCTP, ANXA2) (I.4). Ponadto wydaje się, że zawarte w suszu składniki bioaktywne wpłynęły na wzrost integralności nabłonka jelitowego, na co mogą wskazywać zmiany ekspresji białek związanych z połączeniami międzykomórkowymi w błonie śluzowej jelita krętego (ACTR3; ANXA2) (I.4), a także obniżenie relatywnej

koncentracji rozpuszczalnej formy antygenu CD14, który jest osoczowym wskaźnikiem integralności bariery jelitowej (I.1).

Uogólniając można stwierdzić, że susz z korzenia cykorii jest tanim i bezpiecznym dodatkiem do paszy dla rosnących świń, którego zastosowanie może pozytywnie wpłynąć na prawidłowy rozwój zwierząt, m.in. poprzez regulację mechanizmów związanych z odpowiedzią na stres oraz pozytywnie wpływając na parametry metaboliczne suplementowanych zwierząt. Ponadto, może wpływać na integralność i dojrzewanie nabłonka przewodu pokarmowego oraz regulować procesy wchłaniania jonów dwuwartościowych.

## Bibliografia

1. Abhari K, Shekarfroush SS, Hosseinzadeh S, Nazifi S, Sajedianfard J i Eskandari MH 2016. The effects of orally administered *Bacillus coagulans* and inulin on prevention and progression of rheumatoid arthritis in rats. *Food and Nutrition Research*.
2. Ahmed N 2009. Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: Neuroprotective effects of *cichorium intybus*. *International Journal of Diabetes and Metabolism*.
3. Al-Dobaib SN i Mousa HM 2009. Benefits and risks of growth promoters in animal production. *Journal of Food, Agriculture and Environment*.
4. Alam M, Ho S, Vance DE i Lehner R 2002. Heterologous expression, purification, and characterization of human triacylglycerol hydrolase. *Protein Expression and Purification*.
5. Barszcz M, Taciak M i Skomial J 2018. Influence of different inclusion levels and chain length of inulin on microbial ecology and the state of mucosal protective barrier in the large intestine of young pigs. *Animal Production Science*.
6. Bernadskaya YY, Patel FB, Hsu H-T i Soto MC 2011. Arp2/3 promotes junction formation and maintenance in the *Caenorhabditis elegans* intestine by regulating membrane association of apical proteins. *Molecular Biology of the Cell* 22, 2886–2899.
7. Den Besten G, Bleeker A, Gerding A, Van Eunen K, Havinga R, Van Dijk TH, Oosterveer MH, Jonker JW, Groen AK, Reijngoud DJ i Bakker BM 2015. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a ppar $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*.
8. den Besten G, Lange K, Havinga R, van Dijk TH, Gerding A, van Eunen K, Müller M, Groen AK, Hooiveld GJ, Bakker BM i Reijngoud D-J 2013. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*.
9. Birchbauer A, Knipping G, Juritsch B, Aschauer H i Zechner R 1993. Characterization of the apolipoprotein AI and CIII genes in the domestic pig. *Genomics*.
10. De Boer HC, De Groot PG, Bouma BN i Preissner KT 1993. Ternary vitronectin-thrombin-antithrombin III complexes in human plasma. Detection and mode of association. *Journal of Biological Chemistry*.
11. Böhmer BM, Branner GR i Roth-Maier DA 2005. Precaecal and faecal digestibility of inulin (DP 10-12) or an inulin/*Enterococcus faecium* mix and effects on nutrient digestibility and microbial gut flora. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
12. Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Litynski P, Fowler B, Brandner S i Mohler H 2002. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
13. Bommer U-A 2012. Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP. *The Open Allergy Journal*.
14. Canfora EE, Van Der Beek CM, Jocken JWE, Goossens GH, Holst JJ, Olde Damink SWM, Lenaerts K, Dejong CHC i Blaak EE 2017. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: A randomized crossover trial. *Scientific Reports*.
15. Canfora EE, Jocken JW i Blaak EE 2015. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*.
16. Carpintero R, Piñeiro M, Andrés M, Iturralde M, Alava MA, Heegaard PMH, Jobert JL, Madec F i Lampreave F 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs. *Infection and Immunity*.
17. Chang J, Chance MR, Nicholas C, Ahmed N, Guilmeau S, Flandez M, Wang D, Byun DS, Nasser S, Albanese JM, Comer GA, Heerdt BG, Wilson AJ, Augenlicht LH i Mariadason JM 2008. Proteomic changes during intestinal cell maturation in vivo. *Journal of Proteomics*.
18. Chang PWG, Tsui SKW, Liew CC, Lee CY, Waye MMY i Fung KP 1997. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *Journal of Cellular Biochemistry*.
19. Comalada M, Bailón E, De Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A i Gálvez J 2006. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132, 487–497.
20. Cooper CA, Moraes LE, Murray JD i Owens SD 2014. Hematologic and biochemical reference intervals for specific pathogen free 6-week-old Hampshire-Yorkshire crossbred pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.
21. Demigné C, Morand C, Levrat M-A, Besson C, Moundras C i Rémésy C 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition*.

22. Diao H, Jiao AR, Yu B, He J, Yu J, Zheng P, Huang ZQ, Luo YH, Luo JQ, Mao XB i Chen DW 2017. Stimulation of intestinal growth with distal ileal infusion of short-chain fatty acid: A reevaluation in a pig model. *RSC Advances*.
23. Diao H, Jiao AR, Yu B, Mao XB i Chen DW 2019. Gastric infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes and Nutrition*.
24. Dirkzwager A, Veldman B i Bikker P 2005. A nutritional approach for the prevention of Post Weaning Syndrome in piglets. *Animal Research*.
25. Doctor RB i Nichols M 2004. 3. THE ACTIN CYTOSKELETON IN LIVER FUNCTION. *Principles of Medical Biology*.
26. Elhodaky M i Diamond AM 2018. Selenium-binding protein 1 in human health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*.
27. Fang W, Goldberg ML, Pohl NM, Bi X, Tong C, Xiong B, Koh TJ, Diamond AM i Yang W 2010. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis*.
28. Franco-Robles E i López MG 2015. Implication of fructans in health: Immunomodulatory and antioxidant mechanisms. *Scientific World Journal*.
29. Gałazka I 2002. The composition of chicory flour of selected chicory cultivars Polanowicka and Fredonia in relation to root sizes and the date of harvest. *Food Science Technology Quality* 3, S37–S45.
30. Giometti CS, Liang X, Tollaksen SL, Wall DB, Lubman DM, Subbarao V i Rao MS 2000. Mouse liver selenium-binding protein decreased in abundance by peroxisome proliferators. *W Electrophoresis*.
31. Gori A, Rizzardini G, Van'T Land B, Amor KB, Van Schaik J, Torti C, Quirino T, Tincati C, Bandera A, Knol J, Benhassan-Chahour K, Trabattoni D, Bray D, Vriesema A, Welling G, Garssen J i Clerici M 2011. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: Results of the „cOPA” pilot randomized trial. *Mucosal Immunology*.
32. Greenblatt MB, Tsai JN i Wein MN 2017. Bone turnover markers in the diagnosis and monitoring of metabolic bone disease. *Clinical Chemistry*.
33. Grela ER, Sobolewska S, Kowalczyk-Vasilev E i Krasucki W 2014a. Effect of dietary inulin source on piglet performance, immunoglobulin concentration, and plasma lipid profile. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*.
34. Grela ER, Sobolewska S i Roziński T 2014b. Effect of inulin extracts or inulin-containing plant supplement on blood lipid indices and fatty acid profile in fattener tissues. *Polish Journal of Veterinary Sciences*.
35. Guldiken N, Usachov V, Levada K, Trautwein C, Ziol M, Nahon P i Strnad P 2015. Keratins 8 and 18 are type II acute-phase responsive genes overexpressed in human liver disease. *Liver International*.
36. Hara H, Haga S, Aoyama Y i Kiriya S 2018. Short-Chain Fatty Acids Suppress Cholesterol Synthesis in Rat Liver and Intestine. *The Journal of Nutrition*.
37. Hardie DG 2004. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*.
38. Harding S V., Fraser KG i Wykes LJ 2008. Probiotics Stimulate Liver and Plasma Protein Synthesis in Piglets with Dextran Sulfate-Induced Colitis and Macronutrient Restriction. *The Journal of Nutrition*.
39. Hassan HA i Yousef MI 2010. Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus* L.)-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food and Chemical Toxicology*.
40. Hein Z, Schmidt S, Zimmer KP i Naim HY 2011. The dual role of annexin II in targeting of brush border proteins and in intestinal cell polarity. *Differentiation*.
41. Hennig-Pauka I, Menzel A, Boehme TR, Schierbaum H, Ganter M i Schulz J 2019. Haptoglobin and C-Reactive Protein—Non-specific Markers for Nursery Conditions in Swine. *Frontiers in Veterinary Science*.
42. Van Hoof VO, Hoylaerta MF, Geryf H, Van Mullern M, Lepoutre LG i De Broe ME 1990. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clinical Chemistry*.
43. Idzerda RL, Huebers H, Finch CA i McKnight GS 2006. Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
44. Jiao AR, Diao H, Yu B, He J, Yu J, Zheng P, Huang ZQ, Luo YH, Luo JQ, Mao XB i Chen DW 2018. Oral administration of short chain fatty acids could attenuate fat deposition of pigs. *PLoS ONE*.
45. Johnson-Henry KC, Pinnell LJ, Waskow AM, Irrazabal T, Martin A, Hausner M i Sherman PM 2014. Short-Chain Fructo-oligosaccharide and Inulin Modulate Inflammatory Responses and Microbial Communities in Caco2-bbe Cells and in a Mouse Model of Intestinal Injury. *The Journal of Nutrition*.
46. Judžentienė A i Budiene J 2008. Volatile constituents from aerial parts and roots of *Cichorium intybus* L. (chicory) grown in Lithuania. *Chemija*.
47. Kang K-S 2013. Abnormality on Liver Function Test. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*.
48. Keller J, Ringseis R, Priebe S, Guthke R, Kluge H i Eder K 2011. Effect of L-carnitine on the hepatic transcript profile in piglets as animal model. *Nutrition and Metabolism*.
49. Kim M i Shin HK 2018. The Water-Soluble Extract of Chicory Influences Serum and Liver Lipid Concentrations, Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Fecal Lipid Excretion in Rats. *The Journal of Nutrition*.
50. Kolachala VL, Sesikeran B i Nair KM 2007. Evidence for a sequential transfer of iron amongst ferritin, transferrin and transferrin receptor during duodenal absorption of iron in rat and human. *World Journal of Gastroenterology*.
51. Kondo T, Kishi M, Fushimi T i Kaga T 2009. Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
52. Kurek E, Ruszczynska A, Wojciechowski M, Luciuk A, Michalska-Kacymirow M, Motyl I i Bulska E 2016. Bio-transformation of selenium in Se-enriched bacterial strains of *Lactobacillus casei*. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 67, 253–62.
53. Lamers R-JAN, Van de Sandt JJM, Venema K, Schaafsma G, Van der Greef J, Van Nesselrooij JHJ i Wessels ECHH 2003. A pilot study to investigate effects of inulin on Caco-2 cells through in vitro metabolic fingerprinting. *Journal of Nutrition*.
54. Lee DBN, Jamgotchian N, Allen SG, Kan FWK i Hale IL 2004. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*.
55. Li X, Chen H, Guan Y, Li X, Lei L, Liu J, Yin L, Liu G i Wang Z 2013. Acetic Acid Activates the AMP-Activated Protein Kinase Signaling Pathway to Regulate Lipid Metabolism in Bovine Hepatocytes. *PLoS ONE*.



56. Lin Y, Vonk RJ, Slooff MJH, Kuipers F i Smit MJ 1995. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *British Journal of Nutrition*.
57. Lu J, Zou X i Wang Y 2008. Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*.
58. Luo J, Zheng A, Meng K, Chang W, Bai Y, Li K, Cai H, Liu G i Yao B 2013. Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*. *Journal of Proteomics*.
59. Luo Z, Zhu W, Guo Q, Luo W, Zhang J, Xu W i Xu J 2016. Weaning Induced Hepatic Oxidative Stress, Apoptosis, and Aminotransferases through MAPK Signaling Pathways in Piglets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–10.
60. Madureira PA, Hill R, Miller VA, Giacomantonio C, Lee PW i Waisman DM 2011. Annexin A2 is a novel Cellular Redox Regulatory Protein involved in Tumorigenesis. *Oncotarget*.
61. Mair C, Plitzner C, Domig KJ, Schedle K i Windisch W 2010. Impact of inulin and a multispecies probiotic formulation on performance, microbial ecology and concomitant fermentation patterns in newly weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
62. Manevich Y, Sweitzer T, Pak JH, Feinstein SI, Muzykantov V i Fisher AB 2002. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
63. Marquardt RR i Li S 2018. Antimicrobial resistance in livestock: Advances and alternatives to antibiotics. *Animal Frontiers*.
64. Masri S, Hunigen H, Aiyana A, Rieger J, Zentek J, Richardson K i Plendl J 2015. Influence of age at weaning and feeding regimes on the postnatal morphology of the porcine small intestine. *Journal of Swine Health and Production* 23, 186–202.
65. Morgan EH i Oates PS 2002. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood cells, molecules & diseases*.
66. Myhill LJ, Stolzenbach S, Hansen TVA, Skovgaard K, Stensvold CR, Andersen LOB, Nejsum P, Mejer H, Thamsborg SM i Williams AR 2018. Mucosal barrier and Th2 immune responses are enhanced by dietary inulin in pigs infected with *trichuris suis*. *Frontiers in Immunology*.
67. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF i La Gamma EF 2014. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells - Possible relevance to autism spectrum disorders. *PLoS ONE*.
68. Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, Sichlau RM, Grunddal K V., Poulsen SS, Han S, Jones RM, Offermanns S i Schwartz TW 2013. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*.
69. Nova E, Viadel B, Wärnberg J, Carreres JE i Marcos A 2011. Beneficial Effects of a Synbiotic Supplement on Self-Perceived Gastrointestinal Well-Being and Immunoinflammatory Status of Healthy Adults. *Journal of Medicinal Food*.
70. Nwafor IC, Shale K i Achilonu MC 2017. Chemical Composition and Nutritive Benefits of Chicory (*Cichorium intybus*) as an Ideal Complementary and/or Alternative Livestock Feed Supplement. *Scientific World Journal*.
71. Omary MB, Ku NO i Toivola DM 2002. Keratins: Guardians of the liver. *Hepatology*.
72. Park JY, Seong JK i Paik YK 2004. Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice. *W Proteomics*.
73. Parnell JA i Reimer RA 2010. Effect of prebiotic fibre supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: A dose-response study in JCR:LA-cp rats. *British Journal of Nutrition*.
74. Paßlack N, Vahjen W i Zentek J 2015. Dietary inulin affects the intestinal microbiota in sows and their suckling piglets. *BMC Veterinary Research*.
75. Patterson JK, Yasuda K, Welch RM, Miller DD i Lei XG 2010. Supplemental Dietary Inulin of Variable Chain Lengths Alters Intestinal Bacterial Populations in Young Pigs. *The Journal of Nutrition*.
76. Paunescu T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev S V., Joachimiak A i Woloschak GE 2001. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology*.
77. Pierce KM, Sweeney T, Brophy PO, Callan JJ, Fitzpatrick E, McCarthy P i O'Doherty J V. 2006. The effect of lactose and inulin on intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the gastro-intestinal tract of the weanling pig. *Animal Science*.
78. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M i Kersten S 2010. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research*.
79. Raschka L i Daniel H 2005. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*.
80. Rault-Nania MH, Demougeot C, Gueux E, Berthelot A, Dzimira S, Rayssiguier Y, Rock E i Mazur A 2008. Inulin supplementation prevents high fructose diet-induced hypertension in rats. *Clinical Nutrition*.
81. Rekiel A, Bielecki W i Wiecek J 2010a. The effect of probiotics on the morphological characteristics of the small intestinal mucosa. *Acta Veterinaria Brno*.
82. Rekiel A, Bielecki W, Wiecek J i Kulisiewicz J 2010b. Histological changes in the small intestinal epithelium in fattening pigs fed selected feed additives. *Acta Veterinaria Brno*.
83. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W i Kim K 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *W IUBMB Life*.
84. Roberfroid MB 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*.
85. Roberfroid M 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*.
86. De Rodas BZ, Gilliland SE i Maxwell CV 1996. Hypocholesterolemic Action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Calcium in Swine with Hypercholesterolemia Induced by Diet. *Journal of Dairy Science*.
87. Rodríguez-Suárez E, Duce AM, Caballería J, Arrieta FM, Fern E, Gómara C, Alkorta N, Ariz U, Martínez-Chantar ML, Lu SC, Elortza F i Mato JM 2010. Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. *Proteomics - Clinical Applications*.
88. Rondón LJ, Rayssiguier Y i Mazur A 2008. Dietary inulin in mice stimulates Mg<sup>2+</sup>-absorption and modulates TRPM6 and TRPM7 expression in large intestine and kidney. *Magnesium Research*.
89. Saggi S, Sakeran MI, Zidan N, Tousson E, Mohan A i Rehman H 2014. Ameliorating effect of chicory (*Chichorium intybus* L.) fruit extract against 4-tert-octylphenol induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food and Chemical Toxicology*.
90. Samolińska W, Greła ER i Kiczorowska B 2019. Effects of inulin extracts and inulin-containing plants on haematobiochemical

- responses, plasma mineral concentrations, and carcass traits in growing-finishing pigs. *Journal of Elementology*.
91. Scholz-Ahrens KE i Schrezenmeir J 2007. Inulin and Oligofructose and Mineral Metabolism: The Evidence from Animal Trials. *The Journal of Nutrition*.
  92. Sheverdin V, Jung J i Lee K 2013. Immunohistochemical localization of translationally controlled tumor protein in the mouse digestive system. *Journal of Anatomy*.
  93. Singer FR i Eyre DR 2008. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*.
  94. Strnad P, Stumptner C, Zatloukal K i Denk H 2008. Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. *Histochemistry and Cell Biology*.
  95. Strzalka W i Ziemienowicz A 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*.
  96. Tabung FK, Birmann BM, Epstein MM, Martínez-Maza O, Breen EC, Wu K i Giovannucci EL 2017. Influence of Dietary Patterns on Plasma Soluble CD14, a Surrogate Marker of Gut Barrier Dysfunction. *Current Developments in Nutrition*.
  97. Tako E, Glahn RP, Welch RM, Lei X, Yasuda K i Miller DD 2008. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *British Journal of Nutrition*.
  98. Trautwein EA i Erbersdobler HF 1998. Dietary Inulin Lowers Plasma Cholesterol and Triacylglycerol and Alters Biliary Bile Acid Profile in Hamsters. *JN The Journal of Nutrition*.
  99. Trevisi P, Botti S, Lauridsen C, Pérez J, Papadopoulos D, Roselli M, Levic J i Zentek J 2015. COST Action FA1401 "European network on the factors affecting the gastro-intestinal microbial balance and the impact on the health status of pigs (PiGutNet)". *Journal of Animal and Feed Sciences*.
  100. Tsurumaki M, Kotake M, Iwasaki M, Saito M, Tanaka K, Aw W, Fukuda S i Tomita M 2015. The application of omics technologies in the functional evaluation of inulin and inulin-containing prebiotics dietary supplementation. *Nutrition and Diabetes*.
  101. Tymczyna B, Tatar MR, Krupski W, Tymczyna-Sobotka M, Łuszczewska-Sierakowska I i Bachanek T 2012. Relationships between biochemical bone metabolism indices and morphometric, densitometric and mechanical properties of mandible in 6-month-old pigs. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*.
  102. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E i Pietraforte D 2019. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, 1–19.
  103. Wang B, Wu G, Zhou Z, Dai Z, Sun Y, Ji Y, Li W, Wang W, Liu C, Han F i Wu Z 2015. Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids*.
  104. Wang Q, Zhou Y, Rychahou P, Fan TWM, Lane AN, Weiss HL i Evers BM 2017. Ketogenesis contributes to intestinal cell differentiation. *Cell Death and Differentiation*.
  105. Wen ZS, Lu JJ i Zou XT 2012. Effects of sodium butyrate on the intestinal morphology and dna-binding activity of intestinal nuclear factor- $\kappa$ B in weanling pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*.
  106. Whisner CM i Castillo LF 2018. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. *Calcified Tissue International*.
  107. Wu RY, Abdullah M, Määttänen P, Pilar AVC, Scruten E, Johnson-Henry KC, Napper S, O'Brien C, Jones NL i Sherman PM 2017. Protein kinase C $\sigma$  signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Scientific Reports*.
  108. Wu WT i Chen HL 2011. Konjac glucomannan and inulin systematically modulate antioxidant defense in rats fed a high-fat fiber-free diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
  109. Wu W, Xie J i Zhang H 2016. Dietary fibers influence the intestinal SCFAs and plasma metabolites profiling in growing pigs. *Food and Function*.
  110. Xin J, Zeng D, Wang H, Sun N, Zhao Y, Dan Y, Pan K, Jing B i Ni X 2019. Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance, Intestinal Immunity, and Gut Microbiota in Piglets. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
  111. Xu J, Li Y, Chen WD, Xu Y, Yin L, Ge X, Jadhav K, Adorini L i Zhang Y 2014. Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology*.
  112. Yasuda K, Dawson HD, Wasmuth E V., Roneker CA, Chen C, Urban JF, Welch RM, Miller DD i Lei XG 2009. Supplemental Dietary Inulin Influences Expression of Iron and Inflammation Related Genes in Young Pigs. *The Journal of Nutrition*.
  113. Yasuda K, Roneker KR, Miller DD, Welch RM i Lei XG 2006. Supplemental Dietary Inulin Affects the Bioavailability of Iron in Corn and Soybean Meal to Young Pigs. *The Journal of Nutrition*.
  114. Żary-Sikorska E i Juśkiewicz J 2008. Effect of Fructans With Different Degrees of Polymerization on Bacterial Enzymes Activity, Lipid Profile and Antioxidant Status in Rats. *Polish journal of food and nutrition sciences* 58, 269–272.
  115. Zhang Y, Chen H, Zhu W i Yu K 2019. Cecal Infusion of Sodium Propionate Promotes Intestinal Development and Jejunal Barrier Function in Growing Pigs. *Animals*.

**V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ**

Po uzyskaniu w 2010. roku stopnia doktora odbyłem **3 staże naukowe** w jednej zagranicznej oraz dwóch uznanych krajowych jednostkach naukowych. Pierwszy ze staży realizowany był w **Katedrze Badań nad Nowotworami i Medycyny Molekularnej, Norweskiego Uniwersytetu Nauki**

i **Technologii (NTNU) w Trondheim (01.10.2011 – 16.10.2011)**. Realizację wyjazdu umożliwiło uzyskanie **indywidualnego stypendium Fundacji Rozwoju Systemu Edukacji w ramach Funduszu Stypendialnego i Szkoleniowego (nr wniosku FSS/2011/V/D3/W/0110)**. Celem pobytu było dopracowanie metod przygotowania prób do procesu elektroforezy różnicującej w żelu poliakryloamidowym, dobór odpowiednich technik postelektroforetycznego barwienia żeli, archiwizacji żeli oraz ich analiza bioinformatyczna, a także identyfikacji białek z użyciem spektrometru masowego typu MALDI-ToF/ToF (stosowna dokumentacja potwierdzająca założenia stażu, potwierdzenie jego odbycia oraz pozyskanego stypendium stanowią załącznik nr 7). Uzyskana w trakcie stażu wiedza i umiejętności, a także opracowane protokoły metodyczne zostały wykorzystane w większości publikacji stanowiących mój dorobek naukowy w zakresie badań proteomicznych. Ponadto, dopracowanie protokołów analitycznych przeprowadzone zostało na tkankach zwierzęcych (wątroba oraz nerki świń), co z kolei z powodzeniem zostało wykorzystane podczas przygotowywania założeń metodycznych projektu badawczego (NCN „SONATA”, 2012/05/D/NZ9/01604), w ramach którego przeprowadzone zostały m.in. prace badawcze stanowiące prezentowane w autoreferacie osiągnięcie naukowe (zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2b ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce).

W trakcie kolejnego **stażu badawczego realizowanego w Zakładzie Genomiki Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu (14.09.2015 – 27.09.2015)** wykonywałem analizy związane z realizacją projektu badawczego (NCN „SONATA”, 2012/05/D/NZ9/01604). Badania miały na celu analizę ekspresji wybranych genów w wątrobie prosiąt pod wpływem suplementacji diety fruktanami typu inulinowego, co stanowiło weryfikację wyników badań zmian ekspresji składowych profili białkowych z użyciem elektroforezy dwukierunkowej oraz spektrometrii mas. Wyniki opisanych analiz zostały opublikowane w oryginalnym artykule: **Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Barszcz M., Jaszczuk-Kubiak E., Pierzchała M., Tuśnio A., Skomiał J., 2017, Hepatic proteome changes induced by dietary supplementation with two levels of native chicory inulin in young pigs, Livestock Science, 203, 54-62**. Ponadto, podczas stażu omówione zostały założenia doświadczeń będących bazą dwóch projektów badawczych. Oba z nich uzyskały finansowanie ze źródeł zewnętrznych. Pierwszy projekt, którego byłem kierownikiem (**NCN „MINIATURA1”, 2017/01/X/NZ9/01173**) zatytułowany „Wpływ suplementacji diety wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi o zróżnicowanym stosunku kwasów omega 6/3 na metabolizm mięśnia sercowego myszy – analiza proteomiczna”, został zrealizowany we współpracy z pracownikami Zakładu Genomiki i Bioróżnorodności IGHZ PAN w Jastrzębcu. Drugi z nich realizowany jest również w w/w jednostce pod kierownictwem dr hab. Mariusza Pierzchały prof. IGHZ w ramach szkoły doktorskiej Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność” (**No. 05-1/KNOW2/2015**). Dzięki współrealizacji tego projektu powierzono mi funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Pani mgr Kamili Stepanow, polegającej

na opiece naukowej w trakcie wykonywania badań proteomicznych zaplanowanych w w/w projekcie (dokumentacja potwierdzająca założenia stażu, potwierdzenie jego odbycia, potwierdzające otrzymanie projektu oraz powierzenie funkcji promotora pomocniczego stanowią załącznik nr 7).

Trzeci staż zrealizowałem w Zakładzie Podstaw Żywienia Zwierząt Monogastrycznych Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonnej (10.07.2016 – 25.07.2016). W trakcie pobytu rozszerzałem swój warsztat badawczy wykonując analizy z zakresu chromatografii gazowej (oznaczenia lotnych kwasów tłuszczowych) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (oznaczenia koncentracji polifenoli). Ponadto, zapoznałem się z obsługą multidyscyplinarnego spektrofotometru diagnostycznego, wykonując oznaczenia wskaźników biochemicznych m.in. do projektu badawczego realizowanego wspólnie z pracownikami jednostki przyjmującej (NCN „SONATA”, 2012/05/D/NZ9/01604). Wynikiem realizacji stażu są następujące prace naukowe: **Lepczyński A., Herosimczyk A., Barszcz M., Ożgo M., Taciak M., Skomiał J., 2016, Inulin-type fructans trigger changes in iron concentration and activity of bone metabolism biomarkers in blood plasma of growing pigs, Journal of Animal and Feed Sciences, 25, 343-347; Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Barszcz M., Jaszczuk-Kubiak E., Pierzchała M., Tuśnio A., Skomiał J., 2017, Hepatic proteome changes induced by dietary supplementation with two levels of native chicory inulin in young pigs, Livestock Science, 203, 54-62.** Ponadto, dzięki kontynuacji współpracy z pracownikami obecnego Zakładu Żywienia Zwierząt IFZZ PAN powstają, kolejne prace naukowe (dokumentacja potwierdzająca założenia stażu oraz potwierdzenie jego odbycia stanowią załącznik nr 7).



## **VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.**

Na mój dorobek dydaktyczny składa się realizacja zajęć z 15 przedmiotów w ramach trzech obecnie prowadzonych na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie kierunków kształcenia: zootechnika, biotechnologia oraz kynologia, a także kierunkach biologia oraz bioinformatyka, które zostały usunięte z jego oferty dydaktycznej. Ponadto realizuję zajęcia z przedmiotów *Animal Physiology* oraz *Proteomics* w j. angielskim w ramach programu ERASMUS+. Jestem również autorem treści programowych dwóch przedmiotów „Pro- i prebiotyki w diecie psów” oraz „Cell biology” odpowiednio dla studentów kierunku kynologia oraz studentów z wymiany międzynarodowej w ramach programu ERASMUS+. Zestawienie realizowanych kursów dydaktycznych zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz prowadzonych zajęć dydaktycznych

Lp.	Przedmiot	Kierunek	Forma zajęć	Rok/stopień
1	Fizjologia zwierząt	Zootechnika	ćwiczenia laboratoryjne	II/°I
		Kynologia	ćwiczenia laboratoryjne	II/°I
		Biotechnologia	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°I
		Biologia	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°I
2	<i>Animal Physiology</i>	<i>LLP Erasmus/ Erasmus+</i>	<i>wykłady/ćwiczenia laboratoryjne</i>	-
3	Anatomia funkcjonalna i fizjologia ssaków	Bioinformatyka	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	II/°I
4	Fizjologia zwierząt z anatomią	Rolnictwo	ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
5	Biologia komórki	Biotechnologia	wykłady/ ćwiczenia laboratoryjne i audytoryjne	I/°I
		Biologia	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne/audytoryjne	I/°I
		Bioinformatyka	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	I/°I
		Mikrobiologia stosowana	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	I/°I
5	Proteomika	Biotechnologia	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	II/II°
		Biologia	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	III/I°
		Mikrobiologia stosowana	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	I/II°
5	Proteomics	<i>LLP Erasmus/ Erasmus+</i>	<i>wykłady/ćwiczenia laboratoryjne</i>	-
6	Genomika i Proteomika	Bioinformatyka	wykłady/ćwiczenia laboratoryjne	III/I°
7	Markery i mapy białkowe	Biotechnologia	wykłady/ćwiczenia audytoryjne	III/II°
		Biologia	wykłady/ćwiczenia audytoryjne	III/II°
8	Endokrynologia ssaków	Biotechnologia	ćwiczenia audytoryjne	IV/I°
9	Fizjologiczne konsekwencje genetycznej modyfikacji czynności organizmu	Biotechnologia	konwersatoria	I/II°

10	Urządzenia technologiczne i aparatura badawcza w biotechnologii	Biotechnologia	ćwiczenia audytoryjne	IV/I°
11	Podstawy farmakologii i farmakokinetyki	Biotechnologia	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	V/I°
12	Fizjologiczne mechanizmy komunikacji zewnątrz-wewnątrzkomórkowej	Biotechnologia	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	IV/I°
		Biologia	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	IV/I°
13	Molekularne wskaźniki predykcyjne płynów ustrojowych	Biotechnologia	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	III/II°
		Biologia	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	III/II°
14	Białkowe markery w ocenie zdrowia i wydolności fizycznej koni	Zootechnika	wyklady/ćwiczenia audytoryjne	III/II°
15	Biologia i biochemia nowotworów	Biotechnologia	ćwiczenia audytoryjne	III/II°

Z uwagi na potrzebę umiędzynarodowienia kształcenia w latach 2013 - 2019 pełniłem opiekę naukową nad 8. studentami w ramach programu praktyk międzynarodowych realizowanych we współpracy z organizacją IAESTE. Informacje na temat poszczególnych studentów wraz z czasem pobytu w mojej macierzystej jednostce zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Opieka naukowa nad studentami w ramach programu IAESTE

Lp.	Studenci z ośrodków zagranicznych w ramach programu praktyk IAESTE	Czas pobytu
1	Ranjitha Hebri; Bangalore University; Indie	18.03.2019 – 17.06.2019
2	Stephany Kitamura; Sao Paulo State University; Brazylia	01.11.2018 – 31.01.2019
3	Gregor Bordon; University of Ljubljana; Słowenia	27.03.2018 – 25.06.2018
4	Schivani Acharya; Manipal Institute of Technology; Indie	01.03.2018 - 31.05.2018
5	Tempini Dario; ETH in Zurich; Szwajcaria	09.10.2017 – 08.01.2018
6	Maia de Paula; Federal University of Viçosa; Brazylia	03.10.2016 – 07.01.2017
7	Ivona Raić; University of Mostar; Chorwacja	30.03.2016 – 10.07.2016
8	Girelli Caio Wojślaw; Universidade de Sao Paulo; Brazylia	01.10.2014 – 15.01.2015
9	Thaís Vieira de Souza; Federal University of Amazonas; Brazylia	01.10.2013 – 15.03.2014

Ponadto, jako opiekun studentki z Uniwersytetu Bangalore w Indiach, jednocześnie sprawowałem funkcję promotora pracy magisterskiej (zaświadczenie o powierzeniu mi funkcji opiekuna naukowego stanowi załącznik 8 do wniosku przewodniego). Jestem również promotorem pomocniczym

w przewodzie doktorskim studentki realizującej pracę doktorską w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt w ramach Zintegrowanej Szkoły Doktoranckiej KNOW (zaświadczenie o powierzeniu mi funkcji promotora pomocniczego stanowi załącznik 8 do wniosku przewodniego). Pod moją opieką naukową zrealizowanych zostało 6 prac magisterskich, 8 prac inżynierskich oraz 3 prace licencjackie.


Ponadto, odbyłem pobyt dydaktyczny w ramach programu ERASMUS+ na Wydziale Nauk Rolniczych Uniwersytetu Grzegorza Mendla w Brnie (01.04.2019 – 05.04.2019), podczas którego prowadziłem: seminarium dla studentów II stopnia na kierunku biotechnologia nt. „Workfolw in 2-d gel based proteomics”; seminarium dla doktorantów, dyplomantów i pracowników wydziału nt. “Effects of supplementation of a diet with dried chicory root on protein composition pattern of selected tissues and body fluids in growing pigs”, a także przeprowadziłem zajęcia z przedmiotu “Animal Physiology” dotyczące układu nerwowego. Od roku 2018 jestem opiekunem Studenckiego Koła Naukowego Proteomiki “Proteios”.

Do głównych aspektów mojej działalności organizacyjnej można zaliczyć: członkostwo w Radzie Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt w latach 2017-2019; członkostwo w Radach Programowych kierunków studiów Biotechnologia (2012-2016) oraz Kynologia (2016-2019). W latach 2011-2016 byłem powoływany przez JM Rektora ZUT w Szczecinie na Członka Komisji Konkursu Biologicznego dla szkół ponadgimnazjalnych województwa zachodniopomorskiego. Poza działalnością w ramach struktury uczelni, byłem członkiem komitetu organizacyjnego 85. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego organizowanego przez szczecińskie koło PTZ w 2019 roku. Ponadto, jestem pełnomocnikiem Dziekana Wydziału BiHZ ds. promocji Wydziału powołanym na kadencję w latach 2017-2020. W ramach pełnienia tej funkcji, koordynowałem oraz realizowałem szereg przedsięwzięć promujących zarówno moją *Alma Mater*, jak i Wydział, jak również popularyzujących szeroko pojętą naukę, które zostały zestawione w tabeli 3.

*Tabela 3. Działalność na rzecz promocji nauki*

<b>Lp.</b>	<b>Funkcja</b>	<b>Rok akademicki</b>
1	Realizacja warsztatów „Krew darem życia” w ramach programu „Licealista w świecie nauki” (4 edycje)	2014/2015 – 2017/2018
3	Realizacja warsztatów w ramach Europejskiej Nocy Naukowców realizowanej przez Biuro Promocji ZUT, a także koordynacja wydarzenia na poziomie Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt (2 edycje)	2017/2018- 2018/2019
4	Koordynacja oraz realizacja warsztatów dla seniorów w ramach Zachodniopomorskiego Technologicznego Uniwersytetu Trzeciego Wieku (2 edycje)	2017/2018- 2018/2019
5	Realizacja i koordynacja drzwi otwartych wydziału - projekt „Moc Naukowców” (3 edycje)	2016/2017 -

		<b>2018/2019</b>
<b>6</b>	Wygłoszenie serii wykładów w ramach cyklu „Spotkanie z nauką” dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych	<b>2016/2017 - 2019/2020</b>
<b>7</b>	Realizacja warsztatów w szkołach ponadgimnazjalnych województwa zachodniopomorskiego	<b>2016/2017- 2018/2019</b>



## VII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### Opis pozostałego dorobku naukowo-badawczego

Moja dotychczasowa działalność naukowo-badawcza, poza tematyką omówioną w cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, wpisuje się przede wszystkim w następujące zagadnienia:

1. Fizjologia okresu neonatalnego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu żywienia na zmiany proteomu płynów ustrojowych.
2. Wpływ substancji prebiotycznych na organizm świń.
3. Charakterystyka składu białkowego wybranych płynów ustrojowych, tkanek i narządów zwierząt hodowlanych.
4. Poszukiwanie wskaźników charakterystycznych dla wybranych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych u zwierząt doświadczalnych i człowieka.

#### a) *Przed uzyskaniem stopnia doktora*

Pierwsze opublikowane wyniki badań, wynikające z realizacji pracy magisterskiej, dotyczyły analizy wpływu polimorfizmu w wybranych genach na użytkowość zwierząt gospodarskich (**1.3.3; 1.3.4** – numeracja zgodna z wykazem osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny). Analizy te dotyczyły poszukiwania związku polimorfizmu w genie somatoliberyny (*GHRH*) z cechami użytkowości mlecznej bydła czerwono-białego (**1.3.3**). Badając warianty *GHRH/HaeIII* wykazano, że krowy o genotypie AA cechowały się istotnie wyższą wydajnością mleczną, a także zawartością tłuszczu i białka w mleku w porównaniu do zwierząt o genotypach AB oraz BB. Kolejne badania związane były z asocjacją pomiędzy polimorfizmem genu receptora ryanodiny (*RYR1*), nazywanego również genem wrażliwości na stres, a wartością rzeźną świń. W doświadczeniu wykazano, że osobniki o heterozygotycznym genotypie CT charakteryzowały się mniejszą grubością słoniny na grzbiecie oraz wyższą przewodnością mięsa mierzoną w 24h po uboju w porównaniu do zwierząt o genotypie CC (**1.3.4**).



Kolejne badania związane były z głównym nurtem badawczym Katedry Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki dotyczącym fizjologii okresu neonatalnego. Za najważniejsze z nich uznać można pierwsze próby analizy proteomu moczu z wykorzystaniem technik elektroforetycznych, w których analizie poddano wydalanie frakcji białek niskocząsteczkowych wraz z moczem w pierwszym miesiącu życia koźląt. W badaniach tych wykazano, że frakcja białek niskocząsteczkowych jest dominującą frakcją wydalaną wraz z moczem stanowiąc podstawę zjawiska proteinurii neonatalnej, która ma charakter selektywny. Zaobserwowano również postępujące obniżanie wydalania tej frakcji białek w kolejnych dniach życia koźląt, co może świadczyć o zmianach przepuszczalności bariery filtracyjnej w kłębuszkach nerkowych, jak również o selektywnym mechanizmie wchłaniania tych białek w kanalikach nerkowych (1.1.28). W kolejnych doświadczeniach przeprowadzonych na cielętach wykazano istotne zmiany ilościowe i jakościowe w profilach białkowych osocza krwi w pierwszym tygodniu życia. W badaniach tych skoncentrowano się na pomiarze relatywnej koncentracji albumin oraz frakcji białek wysokocząsteczkowych oraz niskocząsteczkowych. Większość frakcji białek o masach zarówno wyższych, jak i niższych od albumin wykazywało wzrost koncentracji w pierwszym tygodniu życia zwierząt. Zmiany obserwowano również w procentowym udziale białek poszczególnych frakcji. Wydaje się, że obserwowane zmiany są efektem zmiany żywienia po urodzeniu zwierząt, sprawności wchłaniania jelitowego oraz usuwania białek drogą nerkową (1.3.2).

Kolejna grupa publikacji dotyczy pourodzeniowych zmian stężeń wybranych elektrolitów u koźląt oraz cieląt w okresie neonatalnym. W pierwszej z nich (1.1.29) zaobserwowano sukcesywne obniżanie koncentracji żelaza w osoczu krwi koźląt w pierwszych dwóch tygodniach życia, po czym sukcesywny wzrost jego koncentracji pomiędzy 14. a 23. dniem życia. W pierwszym tygodniu życia zaobserwowano dynamiczny wzrost całkowitej zdolności wiązania żelaza, która następnie obniżała się do 14. dnia życia, wzrastając do 23. dnia życia. Może to świadczyć o dużym zapotrzebowaniu na żelazo w pierwszych dwóch tygodniach życia koźląt m.in. do procesu hematopoezy, a także wciąż ograniczoną zdolnością do jego absorpcji z przewodu pokarmowego. Mimo żywienia mlekiem matek należy zwrócić uwagę na koncentrację żelaza w osoczu krwi koźląt, ze względu na możliwość wystąpienia niedoboru tego pierwiastka w pierwszych tygodniach ich życia.

W kolejnym doświadczeniu (1.1.27) wykazano dynamiczne zmiany koncentracji miedzi i żelaza w pierwszych dniach życia cieląt. Stwierdzono istotny wzrost osoczowej koncentracji miedzi oraz obniżenie koncentracji żelaza w pierwszych trzech dniach życia zwierząt. Podanie cielętom inhibitora enzymu konwertującego - kaptoprylu spowodowało istotne obniżenie koncentracji żelaza w osoczu krwi badanych cieląt. Nie stwierdzono istotnych zmian koncentracji miedzi w osoczu krwi zwierząt przed i po podaniu kaptoprylu.

b) *Po uzyskaniu stopnia doktora*

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałem zatrudniony na etacie adiunkta w Katedrze Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki. Kształtowałem swoje kompetencje badawcze poszerzając warsztat badawczy zdobywając wiedzę oraz doświadczenie, uczestnicząc w realizacji kolejnych projektów badawczych rodzimej jednostki naukowej, co umożliwiło współpracę z pracownikami z zewnętrznych jednostek naukowych, dzięki czemu rozszerzałem także zakres swoich zainteresowań badawczych, co znalazło odzwierciedlenie w kolejnych publikacjach.

1. Wyniki badań realizowanych w ramach pierwszego nurtu badawczego dotyczącego **fizjologii okresu neonatalnego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu systemu żywienia na zmiany proteomu płynów ustrojowych**, są głównie efektem realizacji dwóch projektów badawczych. Pierwszy z nich, którego byłem głównym wykonawcą, był projektem promotorskim obejmującym zagadnienia związane z realizacją pracy doktorskiej, dotyczącej wpływu żywienia cieląt mlekiem, bądź preparatem mlekozastępczym (KBN N N311 266435). Kolejny projekt, którego byłem wykonawcą, dotyczył wpływu nadmiaru węglowodanów w diecie cieląt na proteom płynów ustrojowych oraz nerkowe mechanizmy regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt w pierwszym miesiącu życia (KBN N N311 012538).

Okres pourodzeniowy jest etapem intensywnych zmian przystosowawczych zachodzących w organizmie cieląt. Intensywne zmiany zarówno strukturalne, jak i czynnościowe zachodzące w przewodzie pokarmowym w okresie pourodzeniowym, są funkcją czasu oraz właściwego żywienia. Pokarmem zapewniającym prawidłowy rozwój cieląt noworodków jest siara, a w kolejnych dniach życia mleko matek. Substytutem mleka podczas odchowu cieląt są preparaty mlekozastępcze. Ich skład znacząco odbiega od składu mleka matek, brak w nich zwłaszcza bioaktywnych komponentów, takich jak: hormony, bioaktywne peptydy, czynniki wzrostu oraz cytokiny, które mają istotny wpływ na rozwój i adaptację nowonarodzonych cieląt do środowiska zewnątrzmacicznego (1.2.2). Stąd ważnym wydawało się podjęcie badań nad oceną wpływu żywienia siarą i mlekiem matek na skład proteomu osocza krwi oraz podstawowych parametrów biochemicznych u cieląt w pierwszych dwóch tygodniach życia, z uwzględnieniem różnic wynikających z zastosowania odmiennego systemu żywienia: pokarmem naturalnym lub preparatem mlekozastępczym.

Analiza proteomu osocza krwi cieląt żywionych siarą w pierwszym tygodniu życia, a następnie mlekiem matek pozwoliła na scharakteryzowanie zmian zachodzących w ekspresji białek tego płynu biologicznego. Najintensywniejsze zmiany ekspresji obserwowano wśród białek związanych z metabolizmem cholesterolu. Dotyczyły one apolipoproteiny AI (apoA-I) oraz apolipoproteiny AIV (apoA-IV), których ekspresja wzrastała w pierwszej dobie życia, a kontynuacja tego wzrostu

obserwowana była w kolejnych dniach pierwszego tygodnia życia cieląt. Zmiany te były zbieżne z dynamiką wzrostu koncentracji składowych profilu lipidowego. Koncentracja cholesterolu całkowitego, cholesterolu związanego z HDL (HDLC) oraz LDL (LDLC), a także trójglicerydów w osoczu krwi badanych zwierząt wzrastała istotnie w kolejnych godzinach i dniach życia. Największą dynamikę wzrostu koncentracji obserwowano dla frakcji HDLC, z którego metabolizmem ściśle związane są apoA-I oraz apoA-IV. Obserwowane zmiany są najprawdopodobniej efektem zmiany głównego źródła energii, którym w okresie życia płodowego były cukry proste oraz aminokwasy, na lipidy których bogatym źródłem jest siara oraz mleko matek (1.1.21). Zwierzęta żywione siarą i mlekiem matek wykazują również wzrost koncentracji białka całkowitego oraz albuminy, a także mocznika w osoczu krwi, przy jednoczesnym obniżeniu koncentracji kreatyniny, co wskazuje na intensywne przemiany o charakterze anabolicznym zachodzące w pierwszych dniach życia tych zwierząt. Ponadto, cielęta żywione naturalnie nie wykazują znamion zaburzeń wodno-mineralnych, na co wskazują stabilne wartości głównych elektrolitów oraz ciśnienia osmotycznego osocza krwi (1.1.24; 1.1.25). W drugim tygodniu życia cieląt żywionych mlekiem matek obserwowano stabilną ekspresję apoA-I oraz apoA-IV, natomiast żywienie zwierząt preparatem mlekozastępczym spowodowało stopniowe obniżenie ekspresji apoA-I, natomiast apoA-IV wykazywało istotne obniżenie ekspresji w pierwszym dniu żywienia preparatem mlekozastępczym, wzrastając stopniowo w kolejnych dniach drugiego tygodnia życia. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w koncentracji wskaźników profilu lipidowego osocza krwi. Koncentracja TC, HDLC oraz LDLC była istotnie niższa w przypadku zwierząt żywionych preparatem mlekozastępczym. Można założyć, że główną przyczyną zmian ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm cholesterolu, jest zmiana jakościowa tłuszczu będącego podstawą diety. U zwierząt żywionych preparatem mlekozastępczym obserwowano wysoką ekspresję haptoglobiny, która obniżała się w kolejnych dniach drugiego tygodnia życia. W przypadku zwierząt żywionych pokarmem naturalnym ekspresja tego białka była poniżej progu detekcji. Wydaje się, że podwyższona ekspresja haptoglobiny u zwierząt żywionych preparatem mlekozastępczym jest efektem stresu wywołanego zmianą systemu żywienia (1.1.17). Obserwowano również istotne różnice stężeń wybranych wskaźników biochemicznych w osoczu krwi pomiędzy cielętami żywionymi mlekiem matek oraz preparatem mlekozastępczym. W przypadku zwierząt żywionych preparatem mlekozastępczym obserwowano niższą koncentrację zarówno białka ogólnego, jak i albuminy, co wskazuje na ograniczoną aprowizację organizmu tych zwierząt w aminokwasy, wynikającą prawdopodobnie z niższej strawności białka zawartego w preparacie. Organizm cieląt w drugim tygodniu życia sprawnie reguluje molalność osocza krwi i głównych elektrolitów decydujących o ciśnieniu osmotycznym niezależnie od sposobu żywienia. O dojrzałości mechanizmów regulujących gospodarkę wodno-elektrolitową świadczą także stabilne stężenia wapnia, magnezu, cynku i miedzi w osoczu krwi. Niemniej, uzasadnionym wydaje się monitorowanie koncentracji miedzi we krwi młodych

cieląt, ze względu na obserwowane niskie, bliskie dolnej granicy wartości referencyjnych stężenia tego elektrolitu (1.1.23).

Skutkiem nieprawidłowości żywieniowych w okresie neonatalnym, wynikających m.in. z nieprawidłowego składu preparatów mlekozastępczych lub przekarmiania zwierząt mogą być biegunki. Są one główną przyczyną zaburzeń wodno-elektrolitowych, które w skrajnych przypadkach mogą doprowadzać do upadków zwierząt. W trakcie biegunek wynikających z nadmiernego żywienia zarówno mlekiem, jak i preparatem mlekozastępczym w przewodzie pokarmowym cieląt akumulowane są związki osmotycznie czynne, co zaburza wchłanianie wody, w efekcie prowadząc do biegunek osmotycznych. Skutkiem postępującego odwodnienia organizmu cieląt są hiponatremia, hipokaliemia oraz hipochloremia. Ponadto, zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej mogą prowadzić do zaburzeń metabolicznych, powodując gwałtowne spadki koncentracji glukozy we krwi, co w konsekwencji może prowadzić do kwasicy metabolicznej (1.2.3). Mając na uwadze powyższe fakty, a także obserwowane we wcześniejszych badaniach różnice w ekspresji składowych proteomu osocza krwi pomiędzy zwierzętami żywionymi mlekiem matek i preparatem mlekozastępczym koniecznym wydawało się przeanalizowanie wpływu żywienia cieląt dietą z nadmiernym udziałem laktozy na proteom osocza krwi oraz moczu cieląt w drugim tygodniu ich życia.

Żywienie cieląt preparatem mlekozastępczym z nadmiarem laktozy spowodowało znaczne rozluźnienie ich stolca, zmianę jego zabarwienia na ciemnozieloną, a także pojawienie się w nim śluzu. Efekt ten wywołany był prawdopodobnie przyspieszeniem pasażu treści przewodu pokarmowego w jelicie cieląt oraz ograniczeniem wchłaniania wody z przewodu pokarmowego. Porównując profile białkowe osocza krwi cieląt sprzed podania nadmiaru laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym i po jego dwukrotnym podaniu zaobserwowano istotne różnice ilościowe w relatywnej koncentracji 6 spotów białkowych z ponad 430 obserwowanych na żelach reprezentujących proteom tego medium. W odpowiedzi na stres wywołany skutkami zastosowania nadmiaru laktozy w diecie cieląt zaobserwowano wzrost ekspresji spotów białkowych reprezentujących białka ostrej fazy: fibrynogen (Fb), alfa-1-b glikoproteinę (A1GB), alfa-1 antytrypsynę (A1AT), co wskazuje na stres wywołany nieprawidłowościami we wchłanianiu wody i podrażnieniem przewodu pokarmowego. Ponadto, obserwowano wzrost ekspresji białek związanych z metabolizmem lipidów apoA-IV oraz apolipoproteiny E (apoE), co wskazuje na redystrybucję cholesterolu w organizmie zwierząt jako wyniku ograniczonego wchłaniania tłuszczu z przewodu pokarmowego wywołanego biegunką. Należy dodać, że w literaturze wskazuje się protekcyjną rolę apoE w przypadku występowania przypadków ciężkich biegunek u dzieci (1.1.11).

Mocz stanowi materiał badawczy o znaczącym potencjale diagnostycznym, oprócz standardowych procedur diagnostycznych coraz częściej badacze skupiają się na analizie

metabolitów zawartych w tym płynie ustrojowym, a także prowadzą badania jego proteomu. Badania proteomu moczu umożliwiają poszukiwanie białek/peptydów związanych z konkretnymi schorzeniami układu wydalniczego, a także markerów charakterystycznych dla procesów fizjologicznych (1.4.3). Dlatego też, w kolejnym doświadczeniu (1.1.10) przeprowadzono analizę profili białkowych moczu przed i po podaniu nadmiaru laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym. Spośród badanych spotów cztery wykazywały wzrost relatywnej koncentracji. Reprezentowały one jak w poprzednim doświadczeniu białka ostrej fazy: A1AT i serotransferynę (Tf). Ponadto, obserwowano obniżenie ekspresji białka wiążącego hormony płciowe (SHBG) oraz cytochromu P450 2E1 (CYP2E1). Nadmiar laktozy w diecie spowodował również wzrost wydalania syntazy cytrynianowej ATP wraz z moczem. Prawdopodobną przyczyną obniżenia koncentracji Tf jest fakt, że jest ono negatywnym białkiem ostrej fazy, dlatego też obniżona osoczowa koncentracja tego białka może wiązać się z jej ograniczonym wydalaniem. A1AT jest białkiem związanym z unieczynnieniem Tf w odpowiedzi ostrej fazy, więc możliwym jest, że zmiany wydalania obu białek są powiązane.

Kolejne badania związane były z analizami mapowania specyficznej lokalizacji akwaporyny 2 (AQP2) w nerkach bydła. Lokalizacja tych białek w nerkach człowieka i zwierząt laboratoryjnych była wszechstronnie przebadana, wraz z mechanizmami związanymi z dystrybucją tego białka pomiędzy wewnątrzkomórkowymi pęcherzykami, a błoną szczytową kanalików zbiorczych nerki, natomiast istniały jedynie pojedyncze opracowania dotyczące immunolokalizacji tego białka w nerkach młodego bydła, z szcążkowymi danymi dotyczącymi regulacji aktywności tego białka. Dlatego też pierwsze badania miały na celu określenie immunolokalizacji tego białka w nerkach cieląt (1.1.20). Immunohistochemiczna analiza potwierdziła obecność AQP2 w komórkach głównych kanalików zbiorczych nerek u cieląt rasy polsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Immunolokalizacja AQP2 została wykazana jedynie w komórkach nabłonka sześciennego kanalików zbiorczych w promieniach rdzennych kory oraz rdzeniu nerek cieląt. Silną immunoreakcję obserwowano szczególnie w błonie szczytowej komórek kanalików zbiorczych, co jest charakterystyczne również dla innych gatunków zwierząt. Ponadto, w analizowanych preparatach nerek cieląt, stwierdzono słabą ekspresję AQP2 również w błonie podstawnej, a także wewnątrzkomórkowych pęcherzykach. Do analizy immunocytochemicznej AQP2 w nerkach cieląt wykorzystano przeciwciała „anti – total” AQP2, co uniemożliwiało analizy dystrybucji poszczególnych ufosforylowanych form tego białka. Było to podstawą do dalszych badań, które miały na celu analizę immunolokalizacji AQP2 ufosforylowanej w pozycji ser-261, która w kolejnych opracowaniach dotyczących bydła dotąd nie była analizowana (1.1.2). Z badań jednoznacznie wynika, że AQP2 ser-261 jest zlokalizowana w szczytowej błonie komórek głównych kanalika zbiorczego, co wskazuje na jej istotną rolę w procesie fakultatywnej resorpcji wody w nerkach cieląt. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna potencjalnych kinaz mogących odpowiadać za fosforylację reszt seryny s261 AQP2 wskazały na wysokie

prawdopodobieństwo zaangażowania w ten proces kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK). W badaniach innych autorów wykazano, że klasyczna zależna od wazopresyny ścieżka regulacji aktywności AQP2 uzależniona jest od fosforylacji seryny w pozycji s256, dlatego prawdopodobnym jest, że fosforylacja s261 przez kinazę MAP może być odpowiedzialna za niezależną od wazopresyny drogę transferu wody przez AQP2 wbudowywaną w błonę szczytową komórek głównych kanalika zbiorczego.

2. Moje zainteresowania badawcze koncentrują się również na **wpływie substancji o potencjale prebiotycznym na organizm świń**. Badania te realizowane były w ramach projektu badawczego dotyczącego wpływu fruktanów typu inulinowego oraz sposobu ich administracji na metabolizm wybranych tkanek analizowanych na poziomie białek (NCN „SONATA”, 2012/05/D/NZ9/01604). W doświadczeniach analizowano wpływ suplementacji diety rosnących świń inuliną o polimeryzacji wynoszącej średnio 10-12 reszt fruktozowych, z uwzględnieniem zróżnicowanego poziomu suplementacji na poziomie 1 oraz 3% (**1.1.7; 1.1.8, 1.1.9, 1.1.15**). Ze względu na informacje o metabolizowaniu inuliny przez bakterie symbiotyczne już w jelicie cienkim świń uzasadnioną wydawała się analiza proteomu błony śluzowej jelita czczego zwierząt suplementowanych dwoma poziomami natywnej inuliny. Analiza ta wykazała przeciwny kierunek zmian ekspresji białek zaangażowanych w kontrolę podziałów komórkowych, jak i wzrost i dojrzewanie funkcjonalne komórek nabłonka jelitowego w zależności od poziomu suplementacji diety ITF. Wykazano, że 1% dodatek inuliny do diety powoduje obniżenie ekspresji białek zaangażowanych w wymianę i dojrzewanie enterocytów. Suplementacja diety 3% inuliną indukuje istotny wzrost ekspresji białek zaangażowanych w aktywność transkrypcyjną i translacyjną, a także potranslacyjne dojrzewanie białek, dodatkowo wykazując stymulujący wpływ tego dodatku na proliferację i dojrzewanie komórek jelita biodrowego (**1.1.7**). Analiza proteomu wątroby, organu który zaangażowany jest w metabolizm końcowych produktów jelitowej fermentacji inuliny (KKT) wchłoniętych z przewodu pokarmowego wykazała że, pod wpływem obu suplementowanych inuliną diet doszło do stymulacji ekspresji białek zaangażowanych w kontrolę wątrobowego poziomu trójglicerydów oraz cholesterolu. Zmiany ekspresji tych białek znajdują odzwierciedlenie w wyższych koncentracjach zarówno cholesterolu całkowitego, jak i trójglicerydów w wątrobach prosiąt żywionych suplementowanymi dietami, przy jednoczesnym obniżeniu koncentracji cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji związanej z HDL w osoczu krwi tych zwierząt, a różnice w koncentracji tych wskaźników są zależne od poziomu suplementacji (**1.1.8**). W dostępnej literaturze dostępny jest szereg informacji o wpływie fruktanów typu inulinowego na zdolność wchłaniania wybranych makro i mikroelementów z przewodu pokarmowego, jak również na możliwość ich retencji w nerkach, co w konsekwencji wpływa na mechanizmy zaangażowane w regulację homeostazy wodno-elektrolitowej. Dlatego też podjęto się badań mających na celu analizę ekspresji AQP2, w nerkach prosiąt suplementowanych inuliną (1, 2 oraz 3% dodatek

do diety), a także bogatym we fruktany typu inulinowego suszem z korzenia cykorii. AQP2 zaangażowana jest w regulowane stężeniem wazopresyny wchłanianie wody w kanalikach zbiorczych nerek. Wykazano jednoznacznie, że ekspresja AQP2 w nerkach prosiąt wzrasta wraz z udziałem inuliny w diecie prosiąt, co może wskazywać na istotny wpływ suplementacji diety fruktanami typu inulinowego, na koncentrację elektrolitów we krwi świń (1.1.9). Ponadto, wykazano, że suplementacja diet prosiąt inuliną wpływa na regulację osoczowej koncentracji białek zaangażowanych w proces hemostazy. Trendy tych zmian wskazują na przeciwrzepliwy wpływ inuliny, co potwierdza również obniżenie koncentracji fibrynogenu w osoczu krwi suplementowanych zwierząt (1.1.15). Ze względu na kontynuację prowadzonych badań nad wpływem inuliny na organizm prosiąt, które skupiają się na analizie proteomu aorty pod wpływem suplementacji tym fruktanem przeanalizowano możliwość implementacji technik proteomicznych w badaniach procesów fizjologicznych i patofizjologicznych zachodzących w układzie sercowo-naczyniowym (1.2.1).

3. W związku z faktem, że ekspresja genów jest tkankowo specyficzna, a także z rozwojem technologii umożliwiających kompleksową separację, analizę i identyfikację białkowych produktów ekspresji genów koniecznym wydaje się poznawanie i uzupełnianie informacji o składowych profilu białkowego (proteomu) tkanek i narządów, a także płynów ustrojowych zwierząt hodowlanych. Tego typu działania na szeroką skalę prowadzone były w przypadku człowieka, co umożliwiło poznanie proteomu gatunku *homo sapiens* w ponad 90% wraz z wyodrębnieniem proteomów specyficznych dla tkanek, a nawet typów komórek i płynów ustrojowych. W związku z wciąż stosunkowo nielicznymi badaniami nad **poznaniem składu białkowego płynów ustrojowych i tkanek zwierząt hodowlanych**, ważnym jest ich możliwie jak najpełniejsze scharakteryzowanie, co docelowo ułatwi poszukiwanie nowych wskaźników białkowych użytecznych w diagnostyce weterynaryjnej, a także wskazujących na wartość użytkową zwierząt.

a) Osocze krwi stanowi bogate źródło informacji. Szacuje się, że w tym płynie ustrojowym występuje kilka tysięcy różnych białek i peptydów. Ich rozdzielenie i wizualizacja z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej jest utrudnione w związku z faktem, że albumina oraz dziewięć innych białek (fibrynogen, IgG, IgA, IgM, alfa 1 antytrypsyna, transferyna, alfa-2 makroglobulina, haptoglobina, składowa dopełniacza C3) nazywane białkami wysokokopijnymi stanowią ponad 90% białka ogólnego osocza krwi. Pozostałe 10% stanowią białka średnio- oraz niskokopijne, których identyfikacja i analiza jest niezwykle ważna w celu poszukiwania nowych białek charakterystycznych dla określonych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych u zwierząt hodowlanych. Dlatego też w badaniach profili białkowych osocza/surowicy krwi rekomendowane jest usunięcie frakcji białek wysokokopijnych, w celu umożliwienia

pogłębionej analizy pozostałych białek stanowiących frakcję średnio- i niskokopijną. W prowadzonych badaniach nad składem białkowym tych płynów ustrojowych frakcja białek wysokokopijnych była usuwana z wykorzystaniem narzędzia bazującego na bibliotekach heksapeptydów, a frakcje białek średnio- i niskokopijnych były skutecznie wzbogacane, co umożliwiało zwizualizowanie większej liczby protein na żelach 2-D, zwiększając tym samym liczbę zidentyfikowanych w doświadczeniach białek (1.1.6; 1.1.19). Doskonaląc warsztat analityczny modyfikowano również sposoby wizualizacji białek adaptując do tego celu kolejne protokoły barwienia charakteryzujące się wyższą czułością detekcji białek na żelach (1.3.1).

W związku z koniecznością stworzenia powtarzalnej mapy białkowej osocza krwi cieląt we wczesnym okresie pourodzeniowym, jako punktu wyjścia do dalszych analiz związanych z wpływem czynników doświadczalnych na zmiany relatywnej koncentracji białek osoczowych przeprowadzono kompleksową analizę proteomu tego płynu ustrojowego (1.1.26). Badania przeprowadzone zostały na osoczu krwi czterech 7. dniowych cieląt (samcach) rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Separacja białek umożliwiła otrzymanie na dwuwymiarowych żelach (2-D) około 200 spotów białkowych, reprezentujące białka w zakresie mas cząsteczkowych pomiędzy 20 a 250 kDa oraz zakresie punktów izoelektrycznych 4-7. Po wycięciu z żeli spotów białkowych, z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF skutecznie zidentyfikowano 79 z nich. Zidentyfikowane białka reprezentowały 23 różne produkty genowe, które zaklasyfikowano do następujących procesów biologicznych: kaskada krzepnięcia krwi, metabolizm i/lub transport lipidów, transport, białka odpowiedzi ostrej fazy, białka strukturalne, proteazy i inhibitory proteaz.

Kolejne badania skupione były na utworzeniu dwuwymiarowej (2-D) mapy białkowej, odzwierciedlającej charakterystyczny wzór ekspresji białek surowicy krwi 50. dniowych prosiąt (1.1.16). Wykorzystując do tego celu elektroforezę dwukierunkową otrzymano mapę proteomu surowicy prosiąt, na której zwizualizowano 183 spoty białkowe w gradiencie mas cząsteczkowych od 15 do 250 kDa oraz zakresie punktów izoelektrycznych od 3 do 10. Z wyciętych z żelu spotów białkowych zidentyfikowano 105, reprezentujących 37 różnych produktów ekspresji genów. Białka kategoryzowano względem ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji wykazując że: 89,53% zidentyfikowanych białek należało do białek wydzielniczych/zewnątrzkomórkowych, pozostałe białka należały odpowiednio do białek cytoplazmatycznych (9,52%) oraz białek błonowych (0,95%). Białka przyporządkowano również do grup zgodnych z ich przynależnością i funkcją stwierdzając, że 48,57% z nich to białka charakterystyczne dla transportu wewnątrznaczyniowego; 25,71% określono jako białka typowe dla krwi; 11,43% wiązano z kaskadą krzepnięcia krwi i układem dopełniacza; 8,57 jako inhibitory proteaz; 5,72% jako proteazy. Z grupy 37 produktów genowych zidentyfikowanych w doświadczeniu, aż 12 białek nie zostało wcześniej zidentyfikowanych w surowicy/osoczu krwi prosiąt z wykorzystaniem narzędzi proteomicznych,



co stanowiło uzupełnienie dla istniejących dotychczas badań w zakresie mapowania proteomu surowicy krwi świń.

W kolejnych badaniach utworzona została mapa osocza krwi konia. Badaniach miały na celu pogłębioną analizę osocza krwi konia (1.1.6). Analizę przeprowadzono z użyciem osocza krwi trzech klaczy półkrewi Arabskiej. Separacja białek metodą elektroforezy dwukierunkowej pozwoliła na rozdzielenie we frakcji wzbogaconej 286 spotów białkowych w gradiencie mas cząsteczkowych 20 do 250 kDa i zakresie punktów izoelektrycznych 4-7, z których 136 zidentyfikowano z użyciem spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Zidentyfikowane białka reprezentowały 46 specyficznych produktów genowych. Porównanie otrzymanych wyników z wszystkimi opublikowanymi do czasu złożenia manuskryptu badaniami dotyczącymi proteomu osocza krwi koni pozwoliła na wyodrębnienie 22 białek wcześniej nie identyfikowanych na mapach 2-D obrazujących profil białkowy tego medium. Analiza Gene Ontology pozwoliła na przyporządkowanie tych białek do następujących procesów biologicznych: krzepnięcie krwi, odporność nieswoista, metabolizm lipidów, ochrona przed stresem oksydacyjnym, organizacja cytoszkieletu, adhezja komórkowa, a także regulacja syntezy białek. Dodatkowo, należy nadmienić, że aż 18% z nowo zidentyfikowanych białek należy do grupy białek wewnątrzkomórkowych, co wskazuje na możliwość zastosowania analiz proteomu osocza krwi koni do poszukiwania wskaźników związanych z reorganizacją tkanek, a także ich dysfunkcją, czy też uszkodzeniami.

W prowadzonych badaniach podjęto się również próby scharakteryzowania proteomu wątroby rosnących świń (1.1.1). Do badań wykorzystano wątroby ośmiu 50. dniowych prosiąt. W celu uzyskania profili białkowych charakterystycznych dla wątroby, białka prób rozdzielono z użyciem elektroforezy dwukierunkowej, uzyskując mapy białkowe w gradiencie mas cząsteczkowych 15-250kDa oraz zakresie pI 4-7. Na żelach rozdzielono średnio 470 spotów białkowych, z których zidentyfikowano 265. Zidentyfikowane spoty białkowe reprezentowały 142 różnych produktów ekspresji genów. Po analizie porównawczej z dostępnymi w literaturze publikacjami dotyczącymi proteomu wątroby świń, co pozwoliło na wytypowanie 26 produktów genowych wcześniej nie identyfikowanych w tego typu doświadczeniach. Białka te przyporządkowano do znanych procesów biologicznych tj. organizacja cytoszkieletu, odpowiedź na stres i detoksykacja, wtórne przekazywanie wewnątrzkomórkowe, metabolizm energetyczny, struktura proteosomów, oraz transport pęcherzykowy. Utworzona w doświadczeniu, powtarzalna mapa białkowa może być przydatna w charakterystyce metabolizmu komórek wątroby, jak i całego narządu, a także może być wykorzystana w analizach wpływu wybranych czynników na funkcję wątroby u świń, co potwierdzono w badaniach własnych.

b) Kolejna grupa prac dotyczy analiz proteomu płynów ustrojowych i tkanek ryb, w tym wykorzystania elektroforezy 2-D do badań z zakresu technologii żywności (1.1.12), a także próby określenia składu białkowego osocza krwi (1.1.22), serca (1.1.14) oraz nerek (1.1.15)

suma afrykańskiego, jako gatunku zwierząt hodowlanych o szcążkowo poznanym genomie oraz jedynie kilkunastoma zweryfikowanymi na poziomie białek produktami ekspresji poszczególnych genów wchodzących w skład tego genomu. Należy nadmienić, że do czasu opublikowania prezentowanych wyników, badania w tym zakresie były jedynie szcążkowe.

Profilowanie proteomiczne osocza krwi i tkanek suma afrykańskiego przeprowadzono na materiale badawczym pozyskanym od pięciu 8. miesięcznych samców. Analizując osocze krwi (1.1.22) uzyskano profile białkowe w gradiencie mas cząsteczkowych od 15 do 150 kDa i zakresie punktów izoelektrycznych pomiędzy 3 a 10. Spośród 160 spotów białkowych obecnych na żelach zidentyfikowano jedynie 13 spotów białkowych, które w większości reprezentowały produkty genowe niespecyficzne dla tego płynu ustrojowego. Zostały one podzielone na 6 grup: białka transportujące (białko 1 wiążące kwasy tłuszczowe, metalotioneina, mitofertyna-2), białka strukturalne (wimentyna), białka zaangażowane w regulację transkrypcji (receptor alfa A hormonu tarczycowego, homolog czynnika 1 związanego z różnicowaniem komórek nabłonka) oraz inne (homolog białka 6 chłoniaka z dużych komórek B, homolog 2 partnera onkogenu FGR1). Należy zaznaczyć, że białka te zostały zidentyfikowane jako homologi innych gatunków ryb m.in. Danio prążkowanego, co wskazuje na bardzo ubogi zakres informacji dostępny w bazach danych dla suma afrykańskiego w czasie przygotowywania manuskryptu.

Następnie, przeprowadzono analizy mięśnia sercowego i osierdzia suma afrykańskiego (1.1.14). W przypadku obu typów tkanek uzyskano profile białkowe w gradiencie mas cząsteczkowych pomiędzy 15 a 150 kDa oraz zakresie pH 3-10. Na żelach zwizualizowano średnio 185 oraz 210 spotów białkowych, z których zidentyfikowano 13 oraz 25 odpowiednio dla mięśnia sercowego i osierdzia. W przypadku obu tkanek przeprowadzono analizę Gene Ontology (GO) w celu przyporządkowania zidentyfikowanym białkom funkcji molekularnych, a także wskazania ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej. W przypadku mięśniówki serca dystrybucja lokalizacji wewnątrzkomórkowej prezentowała się następująco: 54% stanowiły białka cytoplazmatyczne, 23% białka związane z szkieletem wewnątrzkomórkowym, 13% białka mitochondrialne, a 8% białka charakterystyczne dla jądra komórkowego. Odmienna dystrybucja zidentyfikowanych białek charakteryzowała osierdzie, w przypadku tego medium wykazano: 32% białek cytoszkieletu, 28% białek cytoplazmatycznych, 24% białek mitochondrialnych, 12% jądrowych oraz 4% białek błonowych. Białkom przyporządkowano również funkcje molekularne, w przypadku serca wykazano że: 54% stanowią białka enzymatyczne, 30% białka strukturalne, 8% białka regulatorowe oraz 8% białka wiążące. Zidentyfikowane produkty genowe osierdzia skategoryzowano jako białka strukturalne 36%, enzymatyczne 36%, wiążące 20% oraz 4% regulatorowe i 4% wiążące.

W kolejnych badaniach wykonano próbę określenia składu proteomu nerek suma afrykańskiego (1.1.13). Jak w poprzednich opracowaniach rezultatem separacji białek było otrzymanie powtarzalnych map białkowych nerek, których składowe rozdzielono w gradiencie mas cząsteczkowych od 15

do 250 kDa oraz zakresie pH od 4 do 7. Na żelach obserwowano około 100 spotów białkowych, z których zidentyfikowano jedynie 9. Białka skategoryzowano zgodnie z ich funkcjami biologicznymi na zaangażowane w: organizację cytoszkieletu (aktyna oraz tubulina); metabolizm kwasów tłuszczowych (białko wiążące kwasy tłuszczowe), regulację cyklu komórkowego (ligaza ubikwitynowa), metabolizm energetyczny (enolaza, fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa), ochronę białek przed stresem – chaperoniny (białko szoku cieplnego 70kDa).

Jak wspomniano na wstępie, dostępny warsztat proteomiczny wykorzystany został również do badań z zakresu technologii żywności. Przeprowadzone badania poświęcone były marynatom rybnym. Podczas marynowania śledzi w marynatach na bazie kwasu octowego i soli obserwuje się zjawisko dyfuzji związków azotowych z mięsa ryb do kąpieli marynującej, co powoduje straty jakościowe wyjściowego surowca. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazano, że do kąpieli marynującej dyfundują aktywne enzymy proteolityczne. Filtracja żelowa wraz z chromatografią powinowactwa umożliwiły oczyszczenie i załężenie proteaz asparylowych zawartych w kąpieli marynującej. W drodze analizy aktywności enzymatycznej w specyficznym pH i wykorzystaniem selektywnego blokowania wykazano, że prawdopodobnymi enzymami aktywnymi w roztworze marynującym są katepsyny D oraz E. Ostatecznym potwierdzeniem tego przypuszczenia był rozdział elektroforetyczny załężonych protein, które po wizualizacji map 2-D zlokalizowane były w koordynatach o punktach izoelektrycznych i masach cząsteczkowych odpowiadających katepsynom D oraz E, a także pepsynie. Zakładamy, że odzysk aktywnych enzymów z kąpieli marynującej może pozwolić na uszlachetnienie wyrobów otrzymywanych z surowca gorszego gatunku, lub produkować marynaty z ryb o niskim potencjale przetwórczym (1.1.12).

4. Kolejny nurt badawczy koncentrował się wokół **poszukiwania markerów wybranych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych człowieka i zwierząt modelowych**. Wszystkie badania prowadzone w tym zakresie są wynikiem współpracy z krajowymi ośrodkami badawczymi w ramach projektów badawczych współrealizowanych przez pracowników Katedry. Dotyczyły one charakterystyki proteomu plemników oraz poszukiwania przyczyn specyficznych schorzeń związanych z niepłodnością męską (1.1.4; 1.1.5), poszukiwania wczesnych sygnałów przedimplantacyjnych zarodka w obwodowych strukturach układu immunologicznego (1.1.18), próby wskazania potencjalnych białek wskaźnikowych nowotworu pęcherza moczowego w osoczu krwi człowieka (1.1.3), a także analizy wpływu diet wysokotłuszczowych o zróżnicowanej zawartości kwasów omega 3 oraz 6 na proteom wybranych tkanek myszy.

Celem pierwszych badań było scharakteryzowanie proteomu prawidłowo zbudowanych oraz nie wykazujących ograniczonej ruchliwości plemników pozyskanych od pięciu zdrowych mężczyzn

(1.1.5). Używając do tego celu elektroforezy dwukierunkowej utworzono powtarzalne mapy białkowe plemników w zakresie mas cząsteczkowych 20-200 kDa oraz gradiencie pH 5-8. Spośród rozdzielonych spotów białkowych zidentyfikowano 129, reprezentujących 73 produkty genowe w tym 2 białka, które wcześniej nie zostały zidentyfikowane w tych komórkach (aneksyna 7 oraz 14orf105). Poza białkami typowymi dla struktury plemnika zidentyfikowano szereg białek zaangażowanych w produkcję energii, wskazując na możliwość aktywności dwóch szlaków energetycznych wcześniej nie analizowanych w przypadku plemników; szlak metabolizmu propionianu i maślanu oraz szlak kwasu glioksalowego, co wskazuje na możliwość dostosowywania metabolizmu energetycznego plemników w zależności od panujących warunków środowiska zewnętrznego. Tę hipotezę zdają się potwierdzać wyniki analizy transkryptomicznej, która była uzupełnieniem badań proteomicznych.

Z badań wynika, że w ciągu ostatnich lat znacząco obniżyła się u mężczyzn liczba plemników o prawidłowej ruchliwości i/lub budowie, co prowadzi do zjawiska niepłodności męskiej. Jednym ze schorzeń objawiającym się zupełnym brakiem ruchliwości plemników, przy jednoczesnym braku ich defektów morfologicznych jest astenozoospermia. Dlatego też podjęto się badań, których celem była identyfikacja molekularnych przyczyn izolowanej astenozoospermii (1.1.4). W badaniach porównano profile białkowe wyizolowanych plemników mężczyzn zdrowych oraz z potwierdzoną astenozoospermią. Profile białkowe plemników otrzymano przy zastosowaniu elektroforezy dwuwymiarowej. Uzyskane mapy białkowe analizowano pod względem ilościowym, a spoty białkowe wykazujące istotnie zróżnicowaną ekspresję zidentyfikowano z użyciem spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Pozwoliło to na identyfikację 25 białek wykazujących istotnie zróżnicowaną ekspresję w grupie mężczyzn z astenozoospermią. Wśród nich większość (18 białek) charakteryzowała się obniżoną ekspresją. Analiza bioinformatyczna wykazała, że zidentyfikowane białka są głównie pochodzenia mitochondrialnego i zaangażowane są w proces produkcji energii. Uzyskane wyniki zostały również potwierdzone w badaniach potencjału mitochondrialnego, który był zdecydowanie niższy w przypadku mężczyzn z astenozoospermią, co może świadczyć o niewydolności funkcjonalnej mitochondriów. Pomiar poziomu wydzielanych reaktywnych form tlenu pochodzenia mitochondrialnego był istotnie wyższy w grupie mężczyzn z astenozoospermią, wskazując jednocześnie na zły stan funkcjonalny tych organelli. Analiza uzyskanych danych pozwoliła na wytypowanie trzech białek; laktoferryny, najądrzowego białka wiążącego plemniki 1 oraz deglikazy białkowej DJ-1, których synteza i wydzielanie zachodzi w najądrzach, a ekspresja dwóch z nich, LTF oraz DJ1, jest ściśle skorelowana z występowaniem stresu oksydacyjnego. Przedstawione w pracy wyniki identyfikują punkty krytyczne w szlakach metabolicznych odpowiedzialnych za ruchliwość plemników, co może skutkować przyszłymi aplikacjami diagnostycznymi oraz terapeutycznymi w leczeniu niepłodności.

W czasie ciąży dochodzi do stymulacji układu odpornościowego, a do rozpoznania zarodka przez układ immunologiczny dochodzi jeszcze przed jego implantacją w macicy. Efekty tego rozpoznania obserwowane są lokalnie m.in. w okołomacicznym węzłach chłonnych oraz doczesnej, jednak odpowiedź peryferyczna nie jest tak oczywista. Dlatego też w doświadczeniu podjęto się próby wskazania różnic w proteomie obwodowych limfocytów CD4(+) pochodzących ze śledziony ciężarnych myszy lub zwierząt w pseudo ciąży w 90 godzin od kopulacji (1.1.18). Celem pobocznym było utworzenie powtarzalnej mapy białkowej limfocytów CD4(+), jako punktu wyjścia do analizy różnicowej proteomów. Charakterystyczny wzór białek limfocytów CD4(+) otrzymano przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej, na żelach obserwowano  $373 \pm 30$  spotów białkowych w zakresie mas cząsteczkowych pomiędzy 10 a 120 kDa oraz w gradiencie punktów izoelektrycznych od 4 do 7. Zidentyfikowano 106 spotów białkowych, które reprezentowały 63 produkty genowe charakterystyczne dla myszy domowej. Analiza GO umożliwiła skategoryzowanie białek zgodnie z ich wewnątrzkomórkową lokalizacją: 21,7% stanowiły białka cytoszkieletu; 13,21% białka mitochondrialne; 10,38% białka jądra komórkowego. Pozostałe 15% stanowiły białka: lizosomalne 2,83%; błonowe 1,89%; centrosomalne 0,94% oraz zewnątrzkomórkowe 1,89%. Zidentyfikowane białka przyporządkowano również do znanych procesów biologicznych wykazując, że 33,96% z nich stanowiły białka zaangażowane w wewnątrzkomórkową organizację, 26,42% w komórkowy obrót białek, ochronę przed stresem 8,49%, wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne 8,49%, obronę immunologiczną 3,78%, metabolizm podstawowy 6,6%. Mapa ta stanowiła podstawę do identyfikacji różnic pomiędzy proteomami limfocytów myszy w ciąży oraz pseudociąży, w wyniku której wytypowano 11 spotów białkowych zaangażowanych w reorganizację cytoszkieletu, ruch komórek oraz metabolizm. Najbardziej spektakularne zmiany dotyczyły kofiliny-1 oraz białka czapkującego f-aktyny oraz dehydrogenazy jabłczanowej, których ekspresja była niższa w przypadku limfocytów ciężarnych myszy, co może wskazywać na aktywację obwodowych limfocytów CD4(+) w wyniku rozpoznania zarodka w okresie przedimplantacyjnym.

Rak pęcherza moczowego to nowotwór złośliwy występujący u milionów osób na całym świecie. Z powodu wysokiej zapadalności oraz częstości nawrotów po zakończonym leczeniu wymagany jest aktywny system monitorowania populacji w celu wykrycia tego nowotworu. Postępowanie kliniczne oraz kontrola po resekcji raka pęcherza moczowego obejmują analizę moczu, cytologię oraz cystoskopię. Ze względu na to, że cystoskopia to inwazyjna i kosztocłonna procedura, a cytologia moczu jest metodą o niskiej czułości konieczne jest opracowanie nowych, nieinwazyjnych badań umożliwiających możliwie jak najszybsze wykrycie nowotworu. Aplikacja technologii „omicznych” pozwala na kompleksowy skan potencjalnych molekuł mogących stanowić markery nowotworów pęcherza moczowego.

Mając na uwadze powyższe podjęto się próby poszukiwania potencjalnych białek markerowych charakterystycznych dla przebiegu tej choroby nowotworowej poprzez analizę proteomu osocza krwi (1.1.3). Analiza porównawcza profili białkowych osocza krwi osób z potwierdzonym nowotworem pęcherza moczowego oraz osób zdrowych pozwoliła na wytypowanie 3 grup białek o istotnie zróżnicowanej ekspresji. Pierwszą grupę stanowiły modyfikowane potranslacyjne izoformy transferyny, fibrynogenu-gamma oraz składnika dopełniacza C3b, które nie były obserwowane w osoczu krwi osób zdrowych. Drugą grupę stanowiły haptoglobina, alfa-2 makroglobulina, białko wiążące witaminę D oraz czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego, których relatywna koncentracja w osoczu krwi pacjentów z aktywną chorobą nowotworową była istotnie wyższa. Trzecią grupę stanowią trzy molekularne formy IgM, których relatywna koncentracja w osoczu krwi pacjentów była istotnie niższa. Wytypowane białka związane są z przebiegiem stanu zapalnego, odpornością swoistą oraz procesem krzepnięcia krwi. Wydaje się, że ich wytypowanie może stanowić kolejny krok do opracowania nieinwazyjnego testu użytecznego w praktyce klinicznej.

Kolejne badania zostały wykonane w ramach projektu „MINIATURA1”, 2017/01/X/NZ9/01173, realizowanego we współpracy z pracownikami Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, którego byłem kierownikiem. Przedmiotem projektu były badania mające na celu określenie wpływu nadmiaru wielonienasyconych kwasów tłuszczowych WNKT na metabolizm mięśnia sercowego na poziomie ekspresji białek. Z piśmiennictwa wynika, że KT n-6 i n-3 i ich metabolity modulują procesy biologiczne zachodzące w tkankach poprzez oddziaływanie na drodze genomowej, jako czynniki bezpośrednio regulujące ekspresję genów, i pozagenomowo modyfikując aktywność wybranych szlaków metabolicznych, co opisano w artykule przeglądowym (1.4.1). W wysokich stężeniach KT n-6 i ich eikozanoidy, gł. pochodne kwasu arachidonowego - AA, wpływają na nasilenie m.in. procesów prozapalnych i prooksydacyjnych, choć znane są również pochodne AA: lipooksyny oraz kwasy epoksyeikozatrienowe, które wykazują efekty kardioprotekcyjne. Ze względu na wzrastające spożycie KT n-6, a w konsekwencji zmiany wzajemnego stosunku KT n-6/n-3 we współczesnej „diecie zachodniej” (wynosi on obecnie 15:1 na korzyść KT n-6, co odbiega od rekomendowanego stosunku 3-5:1) kluczowym wydaje się poznanie efektów wysokiej podaży KT n-6 na metabolizm wybranych tkanek, w tym mięśnia sercowego. Biorąc pod uwagę powyższe, założyliśmy hipotezę, że żywienie myszy przez 3 miesiące dietami wysokotłuszczowymi o znacznym udziale nienasyconych kwasów tłuszczowych n-6 oraz n-3 o ich różnym wzajemnym stosunku: zaburzonym 30:1 oraz prawidłowym 5:1 odmiennie wpłynie na metabolizm komórek serca myszy. W wyniku doświadczenia potwierdzono hipotezę badawczą wykazując, odmienny wpływ diet wysokotłuszczowych bogatych w WNKT o zróżnicowanym wzajemnym stosunku kwasów n-6/3, na ekspresję składowych profili białkowych serca żywionych nimi zwierząt.

W przypadku obu diet obserwowano wysoką ekspresję białek związanych z metabolizmem lipidów, co wskazuje na próbę zmetabolizowania jako substratów energetycznych KT w procesie ich  $\beta$ -oksydacji w mitochondriach. Kolejnymi etapami oddychania komórkowego jest włączenie produktów przemiany tłuszczów do cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz produkcja ATP w łańcuchu oddechowym. Proces ten wydaje się być zaburzony w sercach zwierząt żywionych dietą o nieprawidłowym stosunku kwasów n-6/3 (30:1), na co wskazuje obniżona ekspresja białek zaangażowanych w cykl Krebsa oraz białek łańcucha oddechowego w sercach zwierząt tej grupy doświadczalnej. Szczególną uwagę zwraca ekspresja rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej, która była istotnie wyższa w grupie zwierząt żywionych dietą o stosunku kwasów n-6/3 30:1, w porównaniu do grupy żywionej dietą o prawidłowym stosunku tych kwasów. Białko to odpowiedzialne jest za przemianę aktywnych metabolitów AA kwasów epoksyeikozatrienowych, które prawdopodobnie mają działanie kardioprotekcyjne, do ich nieaktywnych metabolitów kwasów dihydroeikozatrienowych. Ten szlak metaboliczny w sercu nie jest dobrze poznany więc wydaje się szczególnie interesującym celem dalszych badań nad wpływem nadmiaru kwasów n-6 na ten narząd. Otrzymane wyniki dają również nadzieje na poznanie kolejnych szlaków aktywowanych w tkankach i narządach pod wpływem nadmiaru KT n-6 i wniesienie istotnego wkładu w rozwój wiedzy na temat ich metabolizmu oraz ich bezpośredniego i pośredniego wpływu na organizm. Wyniki tych badań są podstawą powstającego obecnie manuskryptu, a także stanowią badania wstępne do kolejnego projektu badawczego.

## **Podsumowanie dorobku naukowego**

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 70 pozycji bibliograficznych w tym: 43 publikacje naukowe, 3 rozdziały w monografiach naukowych, 1 rozdział w skrypcie oraz 23 doniesienia i komunikaty prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Wśród publikacji naukowych, 36 artykułów zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR (w tym 4 stanowią cykl wskazany, jako szczególne osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym), kolejnych 7 pozycji zostało opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie z części B wykazu czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (zestawienie publikacji przedstawiono w wykazie osiągnięć naukowych).

Biorąc pod uwagę wartości wskaźników bibliometrycznych przypisanych zgodnie z rokiem wydania poszczególnych publikacji, łączna wartość dorobku naukowego w przeliczeniu na punkty MNiSW wynosi 762, w tym 587 punkty (bez osiągnięcia naukowego) zgromadzone po uzyskaniu stopnia doktora. Sumaryczny *Impact Factor* publikacji jest równy 41,554. Według bazy bibliograficznej Web of Science core collection, liczba cytowań wynosi 123 (bez autocytowań 78), zaś Indeks Hirscha ma wartość 7.

Natomiast, według bazy bibliograficznej Scopus, liczba cytowań wynosi 134 (bez autocytowań 87), zaś Indeks Hirscha ma wartość 7 (stan dla obu waz danych na dzień 21.10.2019).

Zestawienie dorobku naukowego wg. liczby pozycji bibliograficznych, wartości IF z uwzględnieniem punktów MNiSW, przed oraz po uzyskaniu stopnia doktora przedstawiono w poniższym zestawieniu tabelarycznym.

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora		Po uzyskaniu stopnia doktora				Ogółem	
			Jednotematyczny cykl publikacji		Pozostałe publikacje			
	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW	IF	pkt. wg MNiSW
<b>Prace oryginalne w czasopismach z bazy JCR</b>	2,845	52 (3)	6,31	95 (4)	31,274	520 (26)	<b>40,429</b>	<b>667 (33)</b>
<b>Prace oryginalne w czasopismach spoza bazy JCR</b>	-	18 (3)	-	-	-	10 (1)	-	<b>28 (4)</b>
<b>Artykuły przeglądowe w czasopismach z bazy JCR</b>	-	-	-	-	1,125	35 (3)	<b>1,125</b>	<b>35 (3)</b>
<b>Artykuły przeglądowe w czasopismach spoza bazy JCR</b>	-	-	-	-	-	13 (3)	-	<b>13 (3)</b>
<b>Doniesienia i komunikaty</b>	-	- (2)	-	-	-	- (21)	-	<b>- (23)</b>
<b>Rozdziały w monografiach</b>	-	10 (2)	-	-	-	5 (1)	-	<b>15 (3)</b>
<b>Rozdziały w skryptach</b>	-	-	-	-	-	4 (1)	-	<b>4 (1)</b>
<b>Ogółem</b>	<b>2,845</b>	<b>80 (10)</b>	<b>6,31</b>	<b>95 (4)</b>	<b>32,399</b>	<b>587 (56)</b>	<b>41,554</b>	<b>762 (70)</b>

IF - Współczynnik Impact factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla prac z roku 2019 wykazano IF za rok 2018;

pkt. wg MNiSW - Liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy; dla prac z lat 2018, 2019 wykazano liczbę punktów MNiSW za rok 2017;

\* - W nawiasach podano liczbę publikacji;

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

W kolejnej tabeli zestawiono dorobek naukowy wg. liczby publikacji wraz z charakterystyką czasopism w których opublikowano w/w publikacje

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
<b>1. Oryginalne opublikowane prace twórcze</b>	<b>6</b>	<b>31</b>	<b>37</b>
<b>a. w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)</b>	<b>3</b>	<b>30</b>	<b>33</b>
Journal of Physiology and Pharmacology	1	5	6
Folia Biologica (Kraków)	1	3	4
Journal of Animal and Feed Sciences	-	4	4



Medycyna Weterynaryjna	-	3	3
Polish Journal of Veterinary Sciences	-	3	3
Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	-	3	3
Archives of Animal Breeding	1	1	2
Biotechnic & Histochemistry	-	1	1
Turkish Journal of Biology	-	1	1
Food Chemistry	-	1	1
Livestock Science	-	1	1
Animal	-	1	1
Reproductive biology	-	1	1
Advances in Clinical and Experimental Medicine	-	1	1
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition	-	1	1
<b>b. w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
Acta Scientiarum Polonorum Seria Zootechnica	1	1	2
Journal of Animal and Veterinary Advances	1	-	1
Animal Science Papers and Reports	1	-	1
<b>2. Prace Przeglądowe</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>a. w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Medycyna Weterynaryjna	-	2	2
Journal of Elementology	-	1	1
<b>b. w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Journal of Pre-Clinical and Clinical Research	-	1	1
Postępy Biochemii	-	1	1
Przegląd Hodowlany	-	1	1
<b>3. Inne publikacje</b>	<b>4</b>	<b>23</b>	<b>27</b>
a. doniesienia i komunikaty	2	21	23
b. rozdziały w monografiach	2	1	3
c. Rozdziały w skryptach	-	1	1
<b>Razem</b>	<b>10</b>	<b>59</b>	<b>69</b>


W trakcie dotychczasowej pracy naukowej, byłem kierownikiem jednego projektu badawczego, a także wykonawcą 4 projektów KBN/NCN. Ponadto, brałem czynny, potwierdzony publikacjami naukowymi, udział w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych przez KBN, które prowadzono we współpracy z udziałem krajowych ośrodków naukowych.

Ponadto pełniłem funkcję recenzenta 12 publikacji naukowych, z czego 5 w czasopismach naukowych wyszczególnionych w JCR tj. *International Journal of Molecular Sciences* (2); *Molecules* (1); *Clinica Chimica Acta* (1); *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (1). Pozostałe recenzje obejmowały czasopisma o zasięgu międzynarodowym bez współczynnika IF : *Annual Research & Review in Biology* (2); *Journal of Vaccines and Immunology* (2); *Proteomes* (1); *Open Journal of Asthma* (1) *Revista Brasileira de Saúde E Produção Animal* (1).

Prowadzona działalność naukowa pozwoliła na 3 krotne uzyskanie nagród JM Rektora Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie za działalność naukową,

dwukrotnie były to nagrody zespołowe: I stopnia w 2016 roku oraz II stopnia w 2012 roku, a także nagroda indywidualna III stopnia w 2017 roku. Ponadto, w 2012 roku zostałem uhonorowany medalem Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego „Amicus Scientiae et Veritatis” przyznawanym młodym badaczom za działalność naukową.

Szczecin, 21.10.2019 r.

  
.....  
Adam Lepczyński