

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.



AUTOREFERAT

Aktywność macierzystych komórek owalnych oraz makrofagów w przebiegu pierwotnych nowotworów złośliwych wątroby u ludzi i szczurów.

Dr Marta Wójcik

Zakład Patofizjologii
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2018

1. Imię i Nazwisko

Marta Maria Wójcik

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

-stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, specjalność - Patofizjologia, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 20.01.2005 r.; tytuł rozprawy doktorskiej „Zmiany w wydzielaniu ubichinonu Q10 i parametrów wydzielniczych żółci w przebiegu eksperymentalnego stresu oksydacyjnego wątroby u owiec.” (Promotor: Prof. Dr hab. Ryszard Bobowiec, Recenzenci: prof. Dr hab. Wojciech Zawadzki, dr hab. Wojciech Cybulski)

-tytuł: lekarz weterynarii (dyplom lekarza weterynarii nr 24793 z dnia 31.05.1996 r. wydany przez Akademię Rolniczą w Lublinie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

Od marca 2005 r - Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza w Lublinie); adiunkt

Od 1996 r. do marca 2005 r. - Zakład Patofizjologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza w Lublinie); asystent

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Aktywność macierzystych komórek owalnych oraz makrofagów w przebiegu pierwotnych nowotworów złośliwych wątroby u szczurów u ludzi.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Wójcik M.**, Ramadori P., Blaschke M., Sultan S., Khan S., Malik I.A., Naz N., Martius G., Ramadori G., Schultze F.C.: Immunodetection of cyclooxygenase-2 (COX-2) is restricted to tissue macrophages in normal rat liver and to recruited mononuclear phagocytes in liver injury and cholangiocarcinoma. *Histochem. Cell Biol.* 137, 217-233, 2012. (MNiSW= 35 pkt, IF- 2,613)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części oznaczeń immunohistochemicznych oraz przeprowadzeniu analizy białka COX-2, analizy statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu znaczącej części manuskryptu. Mój procentowy udział szacuję na 65%.

2. **Wójcik M.**, Bobowiec R., Lisiecka U., Kostro K.: Proliferation, differentiation and apoptosis of choline deficient ethionine supplemented-rat oval cells under the influence of 2-methoxyestradiol. *J. Phys. Pharm.* 63,6, 669-676, 2012. (MNiSW=25 pkt, IF- 2,476)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, uzyskaniu hepatocellular carcinoma u szczurów w oparciu o model doświadczalny, wykonaniu wszystkich oznaczeń in vitro oraz oznaczeń 2-metoksyestradiolu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 80%.

3. **Wójcik M.**, Giorgi M., Bobowiec R.: Significance of stem cells in hepatocarcinogenesis in rats. (Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji nowotworów wątroby u szczurów). *Medycyna Wet.* 68(9), 562-565, 2012. (MNiSW=10 pkt, IF-0,203).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, uzyskaniu hepatocellular carcinoma u szczurów w oparciu o model doświadczalny, wykonaniu wszystkich oznaczeń in vitro, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 85%.

4. **Wójcik M**, Wessely-Szponder J, Cichoż-Lach H, Celiński K, Bobowiec R. In Vitro proinflammatory polarization of macrophages isolated from hepatocarcinogenic stage in humans and rats. *In Vivo*. 11-12;30(6):853-862, 2016. (MNiSW=15pkt, IF-0.953).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wywołaniu hepatocellular carcinoma u szczurów zgodnie z modelem doświadczalnym, wykonaniu części oznaczeń in vitro, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu części manuskryptu. Mój udział szacuję na 70%.

5. **Wójcik M.**, Bobowiec R., Lisiecka U., Śmiech A. Expression of receptor interacting protein 1 and receptor interacting protein 3 oval cells in a rat model of hepatocarcinogenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine* Vol. 15, (5), 4448-4456, 2018. (MNiSW=15 pkt, IF-1,410).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, uzyskaniu hepatocellular carcinoma u szczurów w oparciu o model doświadczalny, izolacji i hodowli komórek owalnych, wykonaniu oznaczeń w zakresie ekspresji białek RIPK1 i RIPK3 in vitro, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu. Mój udział szacuje na 70%.

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jedno tematycznego cyklu publikacji:

-według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego : **100 pkt.**

-łączny Impact Factor według listy JCR: **7,655**

Badania, których wyniki zostały opublikowane w pracy nr 1 i 2, zostały przeprowadzone w ramach realizacji projektu grantowego N N30831669 33, gdzie **pełniłam funkcję głównego wykonawcy.**

Z kolei wyniki badań zawarte w pracy nr 4 i 5, wykonane zostały w ramach realizowanego projektu grantowego DEC-2014/15B/NZ5/01587, **którego jestem kierownikiem.**

Ponadto część badań, których wyniki zostały opublikowane w pracy nr 1, zostały przeprowadzone w Klinice Gastroenterologii i Endokrynologii, Uniwersytetu w Getyndze, w trakcie trwania **mojego stypendium zagranicznego** przyznanego przez Niemiecką Centralę Wymiany Akademickiej (DAAD, Deutscher Akademischer Austauschdienst).

c) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

1. Znaczenie badań

W skali ogólnoswiatowej rak wątrobowokomórkowy (HCC) (*hepatocellular carcinoma*) jest wymieniany jako jedna z najczęstszych przyczyn zgonów pacjentów z chorobą nowotworową. Większość pacjentów z HCC, jest diagnozowanych w zaawansowanych stadiach choroby, kiedy opcje leczenia są bardzo ograniczone. (Schlageter M. i wsp. 2014, Zou C. i wsp. 2011). Rokowanie HCC jest wątpliwe przy wyjątkowo wysokim wskaźniku śmiertelności (ogólny stosunek śmiertelności do zapadalności 0,93). Nowotwór zdiagnozowany we wczesnym stadium zwykle jest usuwany, niemniej częste wznovy po resekcji guza oraz liczne ogniska przerzutowe powodują, że HCC pozostaje nadal nowotworem bez skutecznej terapii.

Podobnie w przebiegu raka komórek przewodów żółciowych (CA) (*cholangiocarcinoma*), który jest dość częstym pierwotnym nowotworem wątroby występującym u ludzi, rokowania są niepomyślne a brak skutecznej terapii powoduje wysoką śmiertelność (Itatsu K. i wsp. 2009). Dlatego, zarówno w przypadku HCC jak CA, ważne jest, aby wyjaśnić mechanizmy molekularne leżące u podstaw rozwoju tych nowotworów w celu opracowania bardziej konkretnych i skutecznych terapii.

W obu przypadkach nadal pozostaje niewyjaśnione komórkowe pochodzenie nowotworów (Sell S. i wsp. 2002. W toku ostatnich badań zostało stwierdzone, że źródłem HCC oraz CA mogą być somatyczne komórki macierzyste wątroby, nazywane ze względu na swój kształt komórkami owalnymi (KO) (Alison M. i wsp. 1998, Li Ch. i wsp. 2011). Opierając się na dostępnej literaturze oraz własnych badaniach (praca nr b.2, b.3, b.5) mogę stwierdzić, iż KO są pobudzane w stanach chronicznych, ciężkich uszkodzeniach wątroby, zwłaszcza o charakterze nowotworowym. (Parent R. i wsp. 2004) Siedliskiem KO są kanały Heringa, a same komórki są bipotencjalne, mające zdolność do różnicowania się w kierunku hepatocytów oraz cholangiocytołów.

W badaniach dotyczących udziału KO w patogenezie HCC oraz CA, wykorzystuje się wiele modeli doświadczalnych (Heindryckx F. i wsp. 2009, Yang F.Ch. i wsp. 2004). Jak się okazuje, fizjologiczne oraz genetyczne podobieństwa pomiędzy gryzoniami i ludźmi, stosunkowo krótki okres życia gryzoni oraz łatwość hodowli, powoduje, że takie gatunki jak myszy i szczury są najczęściej wykorzystywane do modelowych eksperymentów dotyczących nowotworów. W swojej pracy badawczej wykorzystałam 3 spośród wielu modeli doświadczalnych wykonywanych na szczurach. W jednym z zastosowanych modeli

indukowałam tioacetamidem (TAA) najpierw zwłóknienie wątroby a następnie rozwój raka komórek przewodów żółciowych. (praca nr b.1). Na uwagę zasługuje fakt, iż w 16-tym tygodniu podawania TAA, 80% szczurów miało rozwinięty nowotwór CA. Eksperyment został zakończony w 18-tym tygodniu, kiedy to 100% zwierząt miało rozwinięty nowotwór. Aplikacja doustna TAA oprócz wczesnych i głębokich zmian dysplastycznych w cholangiocytach, wiąże się z podwyższeniem poziomu protoonkogenów c-met i c-erbB2 w komórkach nabłonka przewodów żółciowych, co jest jedną z najczęstszych mutacji genetycznych obserwowanych u ludzi dotkniętych CA. (Yeh CN. i wsp, 2004).

Kolejne dwa modele posłużyły w moich badaniach do wywoływania raka wątrobowokomórkowego z jednoczesną aktywacją komórek owalnych. W pracy nr b.2 szczury żywione były paszą CDE (choline-deficient ethionine supplemented diet). Niedobór choliny, oraz dodatek etioniny jest dobrze ugruntowanym modelem do badania chorób wątroby, ponieważ wzbudza odpowiedź komórek progenitorowych wątroby w celu naprawy uszkodzonej wątroby i ściśle odzwierciedla rozwój choroby u ludzi. Przy krótkotrwałym podawaniu CDE prowadzi do stłuszczenia wątroby u gryzoni, zaś długotrwałe stosowanie ostatecznie powoduje raka wątroby. (Passman AM. i wsp. 2015). W dalszych pracach nr b.3, b.4 i b.5 zastosowałam dwuetapowy model hepatocarcinogenezy polegający na chemicznym transformowaniu przy użyciu dietylnitrozoaminy (DEN) z uprzednim wykonaniem większościowej hepatektomii (partial hepatectomy/dietylnitrozoamine PH/DEN). DEN jako karcinogen środowiskowy jest metabolizowany w wątrobie do reaktywnych metabolitów etylowych, które wchodząc w reakcje z DNA hepatocytów powodują ich uszkodzenia. (Santos NP. i wsp. 2017) Wielu autorów, w tym po raz pierwszy Leduc i Wilson (1958) wykazało, iż takie masowe uszkodzenie hepatocytów i ich niezdolność do podziałów, jest sygnałem do pobudzania puli „rezerwowych komórek owalnych”, które poza doniosłą rolą w regeneracji wątroby, mogą być źródłem HCC. We wszystkich pracach zaliczonych do mojego osiągnięcia badawczego wykorzystywałam modele doświadczalne hepatokarcinogenezy wykonywane na szczurach, ułatwiające poznanie mechanizmów włączonych w procesy proliferacji, różnicowania oraz programowanej śmierci owalnych komórek nowotworowych oraz udziału w hepatokarcinogenezie komórek układu immunologicznego gospodarza. Podjęty przeze mnie temat analizy aktywności KO w przebiegu doświadczalnej hepatokarcinogenezy wiązał się również z rozbieżnością co do włączenia tych komórek w rozwój HCC. Przeprowadzone w ostatnich latach doświadczenia łączące izolację, nowotworową transformację, oraz transplantację komórek owalnych wyraźnie wskazują, iż proliferacja tych komórek może prowadzić do tworzenia guzów w wątrobie (Libbrecht L. i wsp. 2002) Z drugiej jednak strony

wykazano, iż rozwój nowotworów wątroby wynika z nadmiernej proliferacji dojrzałych hepatocytów, a nie komórek owalnych.

Pragnę podkreślić, że wszystkie procedury związane z modelowym wywoływaniem HCC np. wykonanie rozległej hepatektomii, oraz procedury izolacji komórek metodą perfuzji wątroby w warunkach *in situ* wykonywałam osobiście, uzyskawszy uprzednio niezbędne pozwolenia Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie.

2. Analiza aktywności nowotworowych komórek owalnych w przebiegu doświadczalnie wywołanego raka komórek wątrobowych.

W stanach nowotworowych, jak również w ostrej i chronicznej niewydolności wątroby, zahamowanie proliferacji hepatocytów, aktywuje komórki owalne (KO), zasiedlające strefę okołowrotną kanałów Heringa (Tosh D i wsp. 2005). Komórki te, o charakterystycznym owalnym kształcie jądra, pochodzą od multipotencjanych tzw. „dojrzałych komórek macierzystych” wątroby. Do czynników wzrostowych pobudzających proliferację tych komórek, a uruchamianych przy uszkodzeniach wątroby, należą EGF (*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor- α*), HGF(*hepatocyte growth factor*), rodzina TNF(*tumor necrosis factor*) oraz interferon- γ (Naggy P. i wsp.1996). Obok znaczącej roli KO w rozwoju i regeneracji wątroby, wykazano również ich udział w wątrobowej karcinogenezie. W wielu doświadczeniach, opartych na modelu wątrobowej karcinogenezy, rozwój nowotworu był poprzedzony aktywacją komórek owalnych, wykazujących ponadto wysoką ekspresję typowego dla proliferujących komórek markera, jakim jest alfa-fetoproteina (AFP) (Petersen BE. i wsp. 2001). Spośród wielu typowych dla komórek macierzystych markerów, które wykorzystuje się do identyfikacji KO, obok AFP (praca nr b.3, b.5) zastosowałam Thy-1 (CD90) (praca nr b.2). Z kolei nasiloną ekspresję albuminy oraz Ck18 i Ck19 (Cytokeratyny 18 i 19) wykorzystywałam jako wskaźnik różnicowania się KO do hepatocytów i cholangiocytów (praca nr b.2, b.3, b.5)

Oceniając w swoich badaniach aktywność KO wyizolowanych od szczurów z HCC analizowałam przede wszystkim proces proliferacji (praca nr b.2, b.3 i b.5) oraz programowanej śmierci (praca b.2, b.5) tych komórek. Wobec jednak braku udowodnionej skutecznej terapii HCC, analizowałam te parametry nie tylko w hodowlach pierwotnych KO inkubowanych w czystym podłożu hodowlanym ale również eksponowanych na naturalne czynniki mogące w przyszłości mieć swoje zastosowanie w nowych strategiach chemioterapeutycznych obniżających obecną zachorowalność i śmiertelność pacjentów z HCC (praca b.2, b.3)

W dotychczasowych badaniach wykazano, że 2-methoxyestradiol (2-ME), naturalny endogeny, metabolit 17β -estradiolu, w warunkach *in vitro* hamuje wzrost nowotworowych i nienowotworowych linii komórkowych różnego pochodzenia oraz zatrzymuje kaskadę angiogenezy na różnych jej etapach. Przy właściwościach antyproliferacyjnych, jednocześnie wykazano proapoptotyczne działanie 2-ME. (LaVallee TM. i wsp. 2003) Dotychczasowe doniesienia wskazują, że 2-ME od kilku lat jest w centrum zainteresowania jako lek wykorzystywany w terapii przeciwnowotworowej. O jego użyteczności w tej terapii świadczą jego wyjątkowe cechy: nietoksyczność, możliwość aplikowania doustnego oraz selektywne hamowanie proliferacji komórek. W grupie nowotworów poddających się działaniu 2-ME wymieniany jest HCC. Jednakże dostępna literatura opisuje wpływ tego metabolitu jedynie na nowotworowe i prawidłowe linie komórkowe szczurów i ludzi (Hep3B, HepG2, PLC/PRF5, McA-RH7777, JM-1, CRL-1439, CRL-11233). (Kar S. i wsp. 2008). Ponieważ, o czym wspomniałam wcześniej, KO uznawane są przez wielu autorów jako zapoczątkowujące rozwój HCC, w swoich badaniach postanowiłam wykorzystać model doświadczalny HCC i ocenić wpływ 2-ME na proliferację, różnicowanie i apoptozę KO wyizolowanych od szczurów żywionych przez 6 tygodni paszą CDE (praca nr b.2). Hodowle pierwotne KO, uprzednio wyizolowanych metodą perfuzji wątroby, inkubowałam w podłożu hodowlanym bez dodatku 2-ME (kontrola) z dodatkiem 2-ME odpowiednio w stężeniach 0.5, 1.0 i 2.0 μM . Wykazałam, że nowotworowe KO pozostające bez wpływu 2-ME cechowały się nasiloną aktywnością proliferacyjną przy jednoczesnym niskim procencie komórek apoptotycznych. Zastosowany w moim doświadczeniu 2-ME, hamował proliferację KO, zależnie od zastosowanej dawki oraz czasu inkubacji. Najślabszy wpływ antyproliferacyjny oraz proapoptotyczny miał 2-ME użyty w najniższym stężeniu, gdzie tylko nieznacznie zahamował proliferację KO a procent komórek apoptotycznych niewiele się różnił od kontrolnych warunków inkubacji. Dopiero wyższe stężenie 2-ME tj. 1.0 μM , doprowadziło do uzyskania najniższej, obserwowanej w 48 godzinie hodowli, wartości indeksu proliferacji. Z kolei po 72 godzinach, najsilniejsze właściwości hamujące proliferację KO miał 2-ME w stężeniu 2.0 μM . Wykorzystując metodę cytometrii przepływową wykazałam, że 2-ME w stężeniach 1.0 i 2.0 μM nasilał apoptozę nowotworowych KO, których ilość znacząco wzrastała już po 24 godzinach inkubacji. W momencie zakończenia doświadczenia tj. po 72 godzinach inkubacji ilość apoptotycznych komórek była wyższa pod wpływem 1.0 μM 2-ME niż 2.0 μM 2-ME osiągając wartość $70\pm 3.8\%$. Obok antyproliferacyjnego i proapoptotycznego działania 2-ME w swoich badaniach dowiedziałam iż 2-ME ma wpływ na różnicowanie nowotworowych KO. Opierając się na ekspresji markerów typowych dla KO, cholangiocytoz i hepatocytów (odpowiednio Thy-1,

CK-19 i Alb) wykazałam że niezależnie od użytego stężenia 2-ME wraz z czasem trwania doświadczenia ekspresja Thy-1 markera macierzystych komórek owalnych była znacząco niższa w porównaniu do warunków kontrolnych. W przeciwieństwie do średniego i najwyższego stężenia 2-ME, jego najniższe stężenie znacząco i permanentnie zmniejszało ilość komórek ekspresjonujących Thy-1. To samo stężenie 2-ME powodowało większą ilość komórek wykazujących ekspresję CK-19, typowego markera cholangiocytozy. Jak pokazują uzyskane przez mnie wyniki, inkubacja KO bez dodatku 2-ME, prowadziła do występowania tylko niewielkiej liczby komórek z ekspresją Alb. Ekspozycja KO na wyższe stężenia 2-ME nasilały ekspresję Alb, charakterystycznego markera dojrzałych hepatocytów. Największy procent komórek znakujących się Alb obserwowałam pod wpływem działania 1.0 μM 2-ME. Wynosił on odpowiednio $21.5 \pm 6.2\%$ i $23.9 \pm 5.7\%$ po 48h i 72h.

Uzyskane w mojej pracy wyniki wskazują na antyproliferacyjny, nasilający różnicowanie i apoptozę wpływ 2-ME na neoplastyczne KO szczura. Ponadto najniższe dodane do podłoża stężenie 2-ME nasila różnicowanie KO w kierunku cholangiocytozy, podczas gdy wyższe jego stężenia odpowiadają za różnicowanie się KO do hepatocytów.

Mając na względzie fakt, że to nadmierna proliferacja KO, wraz z upośledzonym ich różnicowaniem jest źródłem HCC w swojej kolejnej pracy (praca nr b.3) wykorzystując model PH/DEN, postanowiłam określić zarówno aktywność proliferacyjną KO, jak i status oksydo-redukcyjny wyizolowanych komórek. Wobec doniesień wskazujących na stres oksydacyjny jako kluczowy czynnik nasilający hepatokarcinogenezę postanowiłam eksponować KO na działanie resveratrolu (Res), naturalnego pokarmowego fitoestrogenu i w tych warunkach ocenić wybrane parametry równowagi oksydo-redukcyjnej. Dotychczas wielu autorów wskazywało, że Res może zapobiegać lub spowalniać rozwój wielu chorób, w tym nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, zaburzeń sercowo-naczyniowych, stanów niedokrwienych i infekcji wirusowych, a także zwiększać odporność na stres i wydłużać czas życia pacjentów (Bishayee A. i wsp.2010). W odniesieniu do nowotworów wykazano, że w warunkach *in vitro* Res hamuje proliferację komórek uzyskanych z różnych typów nowotworów. To z kolei doprowadziło do licznych przedklinicznych badań na modelach zwierzęcych oceniających potencjał terapeutyczny tego fitoestrogenu. W dostępnej literaturze nie wykazano jednak wpływu Res na KO, aktywowane podawaniem genotoksycznego karcinogenu – diethylnitrosoaminy (DEN). W przeprowadzonym przez mnie doświadczeniu każde użyte stężenie Res (1 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$) hamowało proliferację nowotworowych KO. Zastosowanie maksymalnego stężenia Res, wiązało się z najniższym

indeksem proliferacji (IP) obserwowanym już po 24 godz. inkubacji. Również po 72 godzinach inkubacji to stężenie istotnie ograniczało proliferację KO.

Wiedząc że Res ma hamujący wpływ na szlak jądrowego czynnika NFκB, tym samym wykazuje właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne, w swojej pracy podjęłam się oceny poziomu anionorodnika ponadtlennkowego ($O_2^{\cdot-}$) oraz aldehydu dwumalonowego (MDA) w hodowlach KO, eksponowanych na różne stężenia Res *in vitro*. (Ren Z. i wsp. 2013). Niestety w stosunku do uwalniania anionorodnika ponadtlennkowego przez KO wpływ Res nie był już tak jednoznaczny jak miało to miejsce w odniesieniu do proliferacji KO. Najniższe stężenie Res praktycznie nie miało większego wpływu na uwalnianie $O_2^{\cdot-}$, którego stężenie utrzymywało się podobnym wysokim poziomie, przez cały okres doświadczenia. Na uwagę zasługuje fakt, że pierwsze 48 godzin ekspozycji KO na najniższe stężenie Res skutkowało większą ilością uwalnianego anionorodnika niż miało to miejsce w hodowli niestymulowanej resweratolem. Znamienne ograniczenie uwalniania $O_2^{\cdot-}$ przez nowotworowe KO obserwowałam jedynie w warunkach ich inkubacji ze 100 μg/ml Res. W tych samych warunkach, jak również pod wpływem 25 μg/ml Res, niezależnie od czasu inkubacji wykazałam obniżony poziom MDA, końcowego produktu peroksydacji lipidów.

Ekspozowanie nowotworowych KO na resweratrol hamuje ich proliferację, a w zależności od stężenia obniża poziom ROS i związany z nimi proces peroksydacji lipidów.

3. Ocena markerów nekroptozy, jako alternatywnej programowanej śmierci nowotworowych komórek owalnych w przebiegu HCC

Jak wspomniano we wstępie wysoka śmiertelność pacjentów z HCC spowodowana jest oprócz częstej wznowy guza, bardzo silną opornością na chemoterapię. W wielu przypadkach u podstaw tej oporności leżą odchylenia w szlaku programowanej śmierci komórek - apoptozy. Należy podkreślić, że proces nowotworowy napędzany jest nie tylko przez mutacje onkogenne, które nasilają liczbę podziałów komórki nowotworowej poprzez np. aktywację cyklu komórkowego ale również hamowanie apoptozy. Ponadto komórki nowotworowe są genetycznie predysponowane do oporności na apoptozę. W takich przypadkach stosowanie konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej, najczęściej indukującej apoptozę, z założenia jest terapią nieskuteczną (Jin J. i wsp. 2013; Schattenberg JM. i wsp.2011; Hu X, i wsp.2007). Jednym z celów mojej kolejnej pracy (praca nr b.5) było określenie potencjału apoptotycznego komórek izolowanych z nienowotworowo uszkodzonej wątroby szczurów (wykonałam tylko rozległą hepatektomię) oraz z doświadczalnie wzbudzonego HCC. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują przede wszystkim na zasadnicze różnice w ilości nowotworowych i

nienowotworowych komórek apoptotycznych i jednocześnie potwierdzają niski potencjał apoptotyczny nowotworowych KO. Komórki izolowane od szczurów z doświadczalnie wywołanym HCC pomimo dość długiego okresu inkubacji (2 tygodnie) ulegały apoptozie tylko w nieznacznym stopniu, niewiele przekraczającym 10% komórek apoptotycznych. Skoro komórki nowotworowe HCC nie ulegają apoptozie, są więc „apoptotycznie” lekooporne, należy poszukać innych ich „słabych punktów”. Jeśli nawet komórki HCC, są odporne na wzbudzenie apoptozy, jest mało prawdopodobne, aby były odporne na wzbudzenie innych szlaków programowanej śmierci, co uznaje się obecnie właśnie za „słaby punkt” HCC. (Hu X i wsp. 2007).

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się mechanizmom wzbudzania nekroptozy, jako alternatywnej drogi programowanej śmierci komórek. W wielu pracach podkreśla się fakt, iż nekroptoza wzbudzana jest szczególnie w tych komórkach, w których zahamowana jest apoptoza. Wielu autorów wskazuje wręcz, że to blokada kaspaz, cząsteczek sygnalizacyjnych apoptozy, faktycznie indukuje nekroptozę. (Fulda S. 2013; Jouan-Lanhouet S. i wsp. 2014). Aktywacja ta zachodzi poprzez uruchomienie receptorowych kinaz białkowych RIPK1 i RIPK3 (receptor interacting protein kinase-1, receptor interacting protein kinase-3). W procesie nekroptozy obie te kinazy tworzą cytoplazmatyczny kompleks RIPK1/RIPK-3 określany mianem nekrosomu, kluczowej struktury molekularnej w przebiegu nekroptozy (Fulda S. 2014; Saeed WK. i wsp. 2014). W swoich badaniach podjęłam próbę analizy ekspresji kinaz RIPK-1 i RIPK-3, a następnie porównania procesu obu rodzajów programowanej śmierci, apoptozy i nekroptozy, w nowotworowych i nienowotworowych komórkach owalnych. Nienowotworowe KO izolowane od szczurów poddanych tylko hepatektomii, wykazywały ekspresję obu kinaz, która utrzymywała się na podobnym, stałym poziomie przez okres inkubacji tj. przez dwa tygodnie. W porównaniu do tych warunków, ekspresja RIP-1 i RIP-3 w nowotworowych KO, nasilała się już od 72 godziny inkubacji. Jednakże, dopiero ostatnie dwa tygodnie inkubacji nowotworowych KO pokazały najsilniejszą ekspresję obu tych kinaz. Uzyskane przez mnie wyniki wskazują, że inaczej niż w przypadku nienowotworowych KO, czynnikiem który pobudza aktywność RIPK-1 a zwłaszcza RIPK-3 w nowotworowych KO jest czas inkubacji. Niestety wysoka ekspresja kinaz, nie wiązała się z zahamowaniem proliferacji nowotworowych KO. Można więc wnioskować, że samo nasilenie nekroptozy jest niewystarczające do zatrzymania rozwoju HCC.

Spośród wielu czynników wzbudzających ekspresję kinaz RIP-1 i RIP-3 tym samym wzbudzających nekroptozę należy wymienić ROS, które nie tylko zapoczątkowują ten proces ale są również cząsteczkami regulacyjnymi nekroptozy. W przeprowadzonych przeze mnie

analizach uwalniany przez nowotworowe KO anionorodnik ponadtlenkowy, pozostawał na wyższym poziomie w stosunku do komórek nienowotworowych. Chociaż niektórzy z autorów wskazują rodniki tlenowe jako cząsteczki „wykonawcze” nekroptozy, to należy podkreślić ich zależny od typu komórki sposób działania (Christofferson DE. i wsp. 2010). I tak mając na względzie nasiloną aktywność proliferacyjną nowotworowych KO, obserwowaną w moim doświadczeniu, wydaje się, że o ile O_2^- skutecznie nasila nekroptozę, o tyle pozostaje bez hamującego wpływu na proliferację nowotworowych KO.

Wyniki mojego doświadczenia wskazują na wysoką aktywność proliferacyjną KO z jednoczesną supresją apoptozy i zachowanym potencjałem nekroptozy.

4. Ekspresja COX-2 w ostrych i chronicznych uszkodzeniach wątroby oraz w przebiegu CA

W badaniach hepatokarcinogenezy podkreśla się znaczenie endogennych związków, które w sposób pośredni bądź bezpośredni wpływają na rozwój nowotworów wątroby. W patogenezie raka komórek przewodów żółciowych (*cholangiocarcinoma*-CA), obok szeregu cytokin, reaktywnych form tlenu czy metaloproteinaz zewnątrzkomórkowego podścieliska (MMPs), brany jest pod uwagę udział cyklooksygenazy-2 (COX-2) (Itatsu K i wsp. 2009). Dotychczasowe badania wskazują, iż ta wzbudzana forma enzymu, odpowiedzialnego za wytwarzanie prostaglandyny PGE_2 , może wpływać na proliferację, apoptozę oraz inwazyjność komórek nowotworowych w przebiegu CA. Należy jednak wziąć pod uwagę istniejące w piśmiennictwie sprzeczne doniesienia dotyczące ekspresji wątrobowej COX-2. Według niektórych autorów, COX-2 wykazuje ekspresję zarówno w tkance zdrowej jak również w stanach uszkodzeń wątroby, a co za tym idzie może być związana z wczesnymi fazami rozwoju przewlekłych chorób wątroby, do których zalicza się również nowotwory (Chariyalertsak S. i wsp. 2001, Giannitrapani L. i wsp. 2009). Ponadto inni autorzy wykazali, że dojrzałe hepatocyty nie wykazują ekspresji genu COX-2 (Casado M. i wsp. 2007; Mohammed NA i wsp. 2004). W odniesieniu do CA, wielu badaczy stwierdziło że komórki nowotworowe są zdolne do ekspresji COX-2 a tym samym mogą być one celem działania inhibitorów COX-2, wykorzystywanych w terapiach wspomagających leczenie nowotworu. (Zhang Z. i wsp. 2004, Thakur P. i wsp. 2010). Pracując na liniach komórkowych, Zhang i wsp., wykazali, że inhibitory COX-2 5-krotnie zredukowały wzrost komórek nowotworowych CCA.

Wykorzystując model doświadczalny z użyciem jednorazowej dootrzewnowej iniekcji TAA powodującej ostre uszkodzenie wątroby oraz podawaniem TAA w wodzie do picia w celu wywołania chronicznego stanu zapalnego, zwłóknienia wątroby aż do rozwoju

cholangiocarcinoma włącznie, postanowiłam określić ekspresję COX-2 na każdym etapie uszkodzenia tego narządu. W celach porównawczych w naszych badaniach użyty został również model doustnego podawania czterochlorku węgla (CCl₄), w celu indukcji ostrego i chronicznego uszkodzenia wątroby przebiegającego z procesem zapalnym. Ponadto wobec istniejących rozbieżności, oceniłam, które komórki wątrobowe wykazują ekspresję COX-2 w poszczególnych fazach uszkodzenia wątroby, zwłaszcza na etapie nowotworzenia. W tym celu zastosowałam metodę podwójnego znakowania immunofluorescencyjnego z użyciem mysich przeciwciał anty-CK-19, -HepPar 1 i -ED1/ED2 (odpowiednio dla cholangiocyty, hepatocytów i tkankowych makrofagów) oraz monoklonalnego lub poliklonalnego przeciwciała anty-COX-2. Dodatkowo wyniki uzyskane w toku badań na szczurzych modelach porównałam do wyników ekspresji COX-2 analizowanych w tkance wątrobowej uzyskanej od pacjentów z marskością wątroby, hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu w Getyndze.

W przeprowadzonych badaniach udowodniłam, że zdrowa tkanka wątrobowa wykazuje ekspresję COX-2, a jedynymi komórkami która ją posiadają są tkankowe makrofagi ED1⁺/ED2⁺. W stanach ostrego uszkodzenia wątroby ekspresja mRNA dla COX-2 zwiększa się 15-krotnie, zwłaszcza po 24 godzinach od zastosowania TAA lub CCl₄. W przypadku chronicznych uszkodzeń zwiększona ekspresja COX-2 w tkance wątrobowej obserwowana była już od 8 tygodnia po podaniu TAA, i utrzymywała się na podobnym poziomie przez następne 10 tygodni, kiedy to u wszystkich zwierząt w grupie rozwinął się CA. Podwójne znakowanie immunofluorescencyjne pozwoliło mi stwierdzić, że stanach chronicznego uszkodzenia wątroby szczurów za wysoką ekspresję COX-2 odpowiadają makrofagi tkankowe (ED1⁺/ED2⁺) występujące jedynie w tzw. guzkach regeneracyjnych (RNs - regenerating nodules), obszarach tkanki wątrobowej typowej dla marskości wątroby. Wykorzystując tkankę wątrobową uzyskaną od pacjentów z marskością wątroby potwierdziliśmy również obecność makrofagów tkankowych (CD68) ekspresjonujących COX-2 w obszarach RNs.

W tkance nowotworowej CA wbrew naszym oczekiwaniom zarówno komórki nowotworowe (zwłaszcza komórki epitelialne z antygenem CK-19) jak również tzw. „zapalne” hepatocyty (Hep Par-1) znajdujące się w mikrośrodoisku guza nie wykazywały ekspresji COX-2. Odpowiedzialne za nią były rekrutowane do mikrośrodoiska guza oraz występujące w bezpośrednio sąsiadującej niezmięnionej nowotworowo tkance fagocytarne komórki jednojądrzaste (ED1⁺/ED2⁻), których ilość istotnie statystycznie wzrastała.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, mogę stwierdzić, że w trakcie rozwoju modelowego CA, poprzez ostre a następnie chroniczne uszkodzenie wątroby ekspresja COX-2

systematycznie wzrasta. Za jej nasiloną ekspresję w ostrych i chronicznych uszkodzeniach wątroby odpowiedzialne są głównie makrofagi tkankowe oraz napływające fagocytarne komórki zapalne. Z kolei te ostatnie, infiltrując tkankę nowotworową CA, jako jedyne wykazują ekspresję COX-2 w guzie.

5. Wykorzystanie ukierunkowanych prozapalnie makrofagów w terapii immunologicznej HCC.

Wykazując w poprzedniej pracy znaczenie makrofagów i komórek zapalnych w rozwoju CA, oraz śledząc wyniki prac badawczych dotyczących wpływu komórek układu immunologicznego w hepatokarcinogenezie, rozpoczęłam kolejne doświadczenia mające na celu „wytrenowanie” makrofagów (Mf) do działającej przeciwnowotworowo frakcji prozapalnej M1. (Blagih J. i wsp. 2012; Cheng SC. i wsp.2014).

W najnowszej literaturze z jednej strony ocenia się wpływ Mf na rozwój nowotworu, z drugiej natomiast poprzez ich specyficzne ukierunkowanie wykorzystuje się je do walki z jednym z najbardziej agresywnych nowotworów jakim jest HCC. Komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, takie jak makrofagi, mogą wykazywać cechy odporności nabytej, a proces nabywania tej odporności nazwano „treningiem immunologicznym”. Jest to niespecyficzna polaryzacja odbywająca się za pomocą ekspozycji Mf na różne czynniki. Dotychczas opisano dwa kierunki polaryzacji Mf: klasyczną aktywację do subpopulacji M1 oraz alternatywną drogę aktywacji do subpopulacji M2. Fenotyp M1 wykazuje działanie prozapalne z uwolnieniem cytokin prozapalnych, reaktywnych form azotu (RNS), reaktywnych form tlenu (ROS) i oprócz działania bakteriobójczego wykazuje aktywność przeciwnowotworową. Natomiast Mf-M2 działają immunosupresyjnie i przyczyniają się do promocji nowotworu. Wykazano, że szczególna subpopulacja makrofagów Tumor Associated Macrophages (TAM), fenotypowo odpowiadająca frakcji Mf-M2, jest odpowiedzialna za remodelowanie tkanek i angiogenezę. (Shirabe K, i wsp.2012). Okazuje się, że w przebiegu HCC, TAM są istotnym komponentem rozwijającego się guza, a ich zwiększająca się ilość jest objawem prognostycznie niekorzystnym co do wyleczenia i przeżycia pacjenta. Nowatorską strategią podczas terapii nowotworów jest zapobieganie polaryzacji makrofagów do M2 lub ukierunkowanie ich do prozapalnej frakcji M1. W swoich wstępnych badaniach opisanych w pracy nr b.4, postanowiłam ocenić skuteczność epigenetycznego reprogramowania *in vitro* Mf uzyskanych od szczurów kontrolnych oraz z doświadczalnie wywołanym HCC. Dla pełniejszego obrazu oraz porównania wyników uzyskanych od szczurów i ludzi, wykonana została również polaryzacja makrofagów uzyskanych od pacjentów zdrowych oraz ze

zdiagnozowanym HCC. W swoich badaniach wykorzystywałam niskie dawki β -glucanu (5-20 μ g), zmieniającego pozyskiwanie komórkowego ATP z procesu fosforylacji oksydacyjnej na szlak glikolizy tlenowej (efekt Watburga), tym samym odpowiedzialnego za epigenetyczny trening Mf do frakcji M1. Inkubując wyizolowane z krwi obwodowej komórki z różnymi dawkami β -glucanu, oceniałam poziom uwalnianego przez Mf anionorodnika ponadtlenkowego, arginazy oraz azotynów, będących stabilnym produktem działania tlenu azotu. W przypadku ludzkich Mf izolowanych od pacjentów z HCC i warunkach *in vitro* eksponowanych na β -glucan, synteza NO była nasiloną, i powiększała się wraz z czasem trwania inkubacji. Podobnych zależności nie wykazałam w stosunku do uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego. Z kolei szczurze makrofagi, izolowane z modelu doświadczalnego HCC, reagowały przede wszystkim na najwyższą dawkę β -glucanu, która powodowała tylko punktowe zmiany w uwalnianiu NO (w 3 dniu inkubacji) i $O_2^{\cdot-}$ (w 5 dniu inkubacji). Według dotychczasowych doniesień w hodowlach makrofagów klasycznie aktywowanych do Mf-M1 oprócz nasilonej ekspresji cytokin prozapalnych tj. TNF α , IL6 i interferon- γ oraz zwiększonej produkcji ROS i RNS, jak to miało miejsce również w moich badaniach, dochodzi do zahamowania aktywności arginazy, co wydaje się być wiarygodnym testem funkcjonalnym potwierdzającym aktywację Mf w kierunku frakcji prozapalnej. Stymulowane β -glucanem Mf ludzkie pochodzące od pacjentów z HCC cechowały się bardzo niską aktywnością tego enzymu w porównaniu do Mf niestymulowanych. Podobny chociaż słabiej wyrażony spadek aktywności arginazy występował w hodowlach ludzkich Mf izolowanych od zdrowych pacjentów.

W przebiegu doświadczenia wyizolowane makrofagi ocenione zostały również pod kątem morfologicznym. Zarówno ludzkie jak i szczurze Mf „wytrenowane” pod wpływem β -glucanu, zmieniały swój kształt w stosunku do komórek niestymulowanych. Charakterystyczna wydłużona postać oraz filopodia cechowały zwłaszcza ludzkie Mf, a zmiany te nasilały się wraz z czasem doświadczenia. W niestymulowanych hodowlach Mf przyjmowały głównie postać zaokrąglonych komórek. Przeprowadzone przeze mnie badania są wstępem do dalszych etapów prac, w których pobudzone i ukierunkowane w warunkach *in vitro* makrofagi będą utrzymywane we wspólnych hodowlach przepływowych 3D razem z komórkami nowotworowymi pochodzącymi zarówno od szczurów z indukowanym HCC oraz pacjentów ze zdiagnozowanym HCC. Pierwsze doniesienia w zakresie tego tematu, zostały przedstawione przeze mnie na Kongresie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (2016 r.) i Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (2017 r.). Tytuły doniesień znajdują się w bibliotecznym wykazie doniesień zjazdowych (Załącznik 3 poz. Nr 1, Nr 4)

Wnioski

Moje wyniki uzyskane w ramach jednotematycznego cyklu publikacji uzasadniają poniższe konkluzje:

1. w odpowiedzi na diethylnitrozoaminę, macierzyste komórki owalne wątroby ulegają aktywacji i są włączone w rozwój HCC;
2. wyizolowane z HCC komórki owalne wykazują nadmierną proliferację, z jednoczesnym upośledzeniem procesu apoptozy. Ponadto, pozostając bez wpływu badanych czynników, nie różnicują się, wyraźnie ekspresjonując markery komórek macierzystych;
3. wykazałam dalej, że zaburzeniom apoptozy nowotworowych komórek owalnych towarzyszy nasiloną ekspresja kinaz włączonych w proces nekroptozy, alternatywnej drogi programowanej śmierci komórek. Może to rodzić nowe perspektywy badań, w których terapeutyczna indukcja nekroptozy będzie podstawą do opracowania nowych koncepcji leczenia „apoptotycznie” opornego raka wątrobowo komórkowego;
4. uzasadniłam następnie, stosując w swoich badaniach endogenny metabolit estradiolu (2-metoksyestradiol), jego antyproliferacyjne i proapoptotyczne działanie na KO, zależne od stężenia oraz czasu ekspozycji. Ponadto okazało się, że 2-ME nasila różnicowanie KO zarówno do cholangiocytołów jak i hepatocytów, co jest potwierdzeniem ich bipotencjalnego charakteru;
5. dostrzegłam przeciwzapalne i antyoksydacyjne działanie resveratrolu wobec nowotworowych KO, proponując stosowanie tego fitoestrogenu w terapii wspomagającej leczenie HCC;
6. mając na uwadze dotychczasowe rozbieżności co do źródła ekspresji COX-2 w nowotworowych uszkodzeniach wątroby w przebiegu *cholangiocellular carcinoma*, dowiodłam że komórkami odpowiedzialnymi za nasiloną ekspresję tego enzymu są fagocytarne komórki zapalne, infiltrujące tkankę guza. Okazało się również, że jedynie tkankowe makrofagi są źródłem ekspresji COX-2 w ostrych i chronicznych nienowotworowych uszkodzeniach wątroby.
7. stwierdziłam, dokonując immunologicznego reprogramowania makrofagów w warunkach *in vitro*, że β -glucan pozwala uzyskać prozapalną frakcję M1. Ma to o tyle duże znaczenie, że procesowi immunologicznego ukierunkowania ulegają nie tylko komórki „zdrowe” ale również „nowotworowe” izolowane od pacjentów ze zdiagnozowanym HCC oraz od szczurów z modelowo wywołanym HCC. W kolejnym etapie moich badań, po przeprowadzonym *in vitro* treningu immunologicznym makrofagów, zamierzam oceniać ich przyżyciowe działanie

zarówno u szczurów jak u ludzi z rakiem wątrobowokomórkowym oraz rakiem komórek przewodów żółciowych, stosując hodowle przepływową 3D, w Systemie Quasi-Vivo.

Literatura:

1. Alison M, Sarraf C. "Hepatic stem cells" *J Hepatol* 1998, 29, 676-682.
2. Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. "Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma" *Cancer Treat Rev.* 2010, 36, 43–53.
3. Blagih J, Jones RG. "Polarizing macrophages through reprogramming of glucose metabolism." *Cell Metabolism* 2012, 15, 793-795.
4. Casado M, Molla B, Roy R, Fernández-Martínez A, Cucarella C, Mayoral R, Boscá L, Martín-Sanz P "Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes." 2007 *Hepatology* 45:631–637.
5. Chariyalertsak S, Sirikulchayanonta V, Mayer D, Kopp-Schneider A, Fürstenberger G, Marks F, Müller-Decker K "Aberrant cyclooxygenase isozyme expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma." *Gut* 2001, 48, 80–86
6. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al. "mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity." *Science* 2014, 345, 1-8.
7. Christofferson DE and Yuan J. "Necroptosis as an alternative form of programmed cell death." *Curr Opin Cell Biol* 2010, 22, 263-268.
8. Fulda S: The mechanism of necroptosis in normal and cancer cell. *Cancer Biol Ther* 2013,14: 999-1004.
9. Fulda S: Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol* 2014, 35: 51-56.
10. Giannitrapani L, Ingrao S, Soresi M, Florena AM, La Spada E, Sandonato L, D'Alessandro N, Cervello M, Montalto G. "Cyclooxygenase-2 expression in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study" *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1155:293–299.
11. Heindryckx F., Colle I., Vlierberghe H." Experimental mouse models of hepatocellular carcinoma research" *Int. J. Exp. Path.* 2009, 90, 367-386.
12. Hu X, Han W and Li L: Targeting the weak point of cancer by induction of necroptosis. *Autophagy* 2007, 3: 490-492.
13. Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, Ohira S, Ishikawa A, Ikeda H et al. "Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by Tumor Necrosis Factor- α ." *Am J Pathol* 2009; 174(3), 829-841.
14. Jin J, Jin X, Qian C, Ruan Y and Jiang H. "Signaling network of OSW-1-induced apoptosis and necroptosis in hepatocellular carcinoma". *Mol Med Rep* 2013, 7: 1646-1650.
15. Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berhe T, Takahashi N and Vandenabeele P. "Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Devel Biol* 2014, 35, 2-13.
16. Kar S, Wang W., Carr BI "2-Methoxyestradiol inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by inhibiting Cdc25 and inducing cell cycle arrest and apoptosis" *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2008, vol 62, No 5, 831-840.

17. La Vallee TM, Zhan XH, Johnson MS, et al. "2-Methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway." *Cancer Res* 2003; 63: 468- 475.
18. Leduc EH, Wilson JW. "Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning; histochemical changes induced by carbon tetrachloride in mouse liver protected by sulfaguanidine." *AMA Arch Pathol.* 1958 Feb;65(2):147-57.
19. Li CH, Wang YJ, Dong W, Xiang S, Liang HF, Wang HY, Dong HH, Chen L, Chen XP." Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with HBx gene and treatment with aflatoxin B1 in vivo." *Cancer Lett.* 2011 Dec 1;311(1):1-10.
20. Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Cell and Developmental Biology* 13, 2002, 389-396.
21. Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-HaWz HA, McMahon RF. "Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis". *J Clin Pathol* 2004, 57:350–354.
22. Nagy P, Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SN. In Vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (Oval) cells after administration of 2-Acetylaminofluorene. *Hematology* 1996, 23, No.1, 71-79.
23. Parent R, Marion M-J, Furio L, Trépo C, Petit M-A. Origin and characterisation of human biopotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004,126,1147-1156.
24. Passman AM, Strauss RP, McSpadden SB, Finch-Edmondson ML, Woo KW, Diepeveen LA, London R, Callus BA, Yeoh GC. "A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet reduces morbidity and retains a liver progenitor cell response" *Disease Models & Mechanisms* 2015 : dmm.022020 doi: 10.1242/dmm.022020 Published 23 October 2015
25. Petersen BE. Hepatic "Stem : cells: coming full circle. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001, 27, 590-600.
26. Ren Z, Wang L, Cui J, Huoc Z, Xue J, Cui H, Mao Q, Yang R. "Resveratrol inhibits NF-kB signaling through suppression of p65 and IkappaB kinase activities." *Pharmazie.* 2013 Aug;68(8):689-94.
27. Saeed WK and Jun DW: Necroptosis: An emerging type of cell death in liver diseases. *World J Gastroenterol* 20: 12526-12532, 2014.
28. Santos NP, Colaço AA .and Oliveira PA." Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review" *Tumor Biology*, March 2017: 1–20, <https://doi.org/10.1177/1010428317695923>
29. Schattenberg JM, Schumann M and Galle PR." Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways." *J Gastroenterol Hepatol* 2011, 26 (Suppl 1): S213-S219.
30. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S and Sorrentino P. "Histopathology of hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* 2014, 20: 15955-15964.
31. Sell S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Cell&Developmental Biology* 2002, 13, 419-424.

32. Shirabe K, Mano Y, Muto J et al. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2012,42, 1-7.
33. Thakur P, Sanyal SN. Chemopreventive action of diclofenac in dimethylbenzanthracene induced lung cancer in female wistar rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2010, 29:255–265.
34. Tosh D, Strain A. Liver stem cells-prospects for clinical use. *Journal of Hepatology* 2005, 42, 75-84.
35. Yang Fu-Chun, Zheng Shu-Sen, Jiang Tian-An.” A modified rat model for hepatocellular carcinoma” *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2004 vol.3, no 4, 585-587.
36. Yeh CN, Maitra A, Lee KF, Jan YY, Chen MF. “Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma” *Carcinogenesis* 2004, 25, Issue 4, 631–636.
37. Zhang Z, Lai GH, Sirica AE Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004, 39:1028–1037.
38. Zou C, Zhang H, Li Q, Xiao H, Yu L, Ke S, Zhou L, Liu W, Wang W, Huang H, et al: “Heme-oxygenase-1: A molecular brake on hepatocellular carcinoma cell migration.” *Carcinogenesis* 2011, 32, 1840-1848.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Głównym nurtem mojej pracy badawczej od początku kariery do chwili obecnej są zaburzenia wątroby u różnych gatunków zwierząt. Pierwsze moje prace doświadczalne dotyczyły badań *in vivo*, z wykorzystaniem osocza krwi oraz żółci zwierząt doświadczalnych. Tematy badań, które realizowałam w okresie **przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych** koncentrowały się przede wszystkim na zaburzeniach wątroby oraz zmianach w metabolizmie tłuszczów w warunkach zaburzonej homeostazy glukozy. Ponadto w tym okresie kariery naukowej rozpoczęłam badania z zakresu zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej (RKZ) u zwierząt. Tematem zaburzeń RKZ zajmowałam się w okresie późniejszym, do chwili obecnej włącznie.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych, opanowałam metody izolacji różnych typów komórek wątroby (hepatocytów, komórek gwiaździstych, komórek owalnych, komórek Kupffera) oraz wykorzystywałam sznurze modele doświadczalne, aby w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem hodowli pierwotnych, zająć się głównie hepatokarcinogenezą. Z uwagi na

statyczny charakter hodowlań komórkowych, które nie zawsze odzwierciedlają patomechanizmy zachodzące w żywym organizmie, w ostatnim okresie wykorzystuję hodowlę przepływową w systemie Quasi-Vivo, która pozwala oceniać wzajemny wpływ inkubowanych komórek. Ponadto w ramach realizowanego i kierowanego przez siebie projektu badawczego NCN, we współpracy z Katedrą i Kliniką Gastrologii z Pracownią Endoskopową, oraz z Kliniką Chirurgii Onkologicznej UM w Lublinie, badam materiał pochodzący od pacjentów ze zdiagnozowanym HCC. Po opanowaniu metod pozyskiwania komórek nowotworowych ze skrawka tkanki wątrobowej, mam możliwość oceny aktywności tych komórek zarówno pod kątem proliferacji jak i programowanej śmierci.

Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia dr. nauk weterynaryjnych

5.1. Zmiany wydzielania żółci, profilu lipoprotein osocza oraz paramentów obrony antyoksydacyjnej w zaburzeniach homeostazy glukozy u zwierząt doświadczalnych.

Dotychczasowe doniesienia o „cholestatycznym” wpływie hiperglikemii, połączonej ze zmianami w metabolizmie lipidów i składzie lipoprotein (Lp), skłoniły mnie do podjęcia w pierwszym przeprowadzonym przez mnie doświadczeniu analizy wpływu cholestyraminy (Cy), nieresorbowalnej żywicy o właściwościach wiązania w jelitach soli żółciowych, na profil frakcji lipoprotein osocza krwi królików z doświadczalnie wywołaną cukrzycą alloksanową. Analizy Lp, z wykorzystaniem ultrawierowania w gradiencie stężeń KBr, pozwoliły wykazać, że u królików cukrzycowych frakcja LDL₁ na skutek obciążenia lipidami przemieszcza się w kierunku lekkiej frakcji VLDL. Podawanie Cy spowodowało zmniejszenie obu tych frakcji i przesunięcie w kierunku frakcji cięższych, z jednoczesnym zmniejszeniem poziomu, oznaczanych metoda enzymatyczną, cholesterolu i soli żółciowych. Szczególnie dotyczy to redukcji zawartości cholesterolu w aterogennej frakcji LDL. W cukrzycy ma miejsce nasilona wątrobowa synteza soli żółciowych, ale o zmienionym profilu, sprzyjającym wchłanianiu jelitowego cholesterolu. Suplementacja Cy nie tylko obniżyła zawartość soli żółciowych w krążeniu jelitowo-wątrobowym ale wyeliminowała sprzyjający wchłanianiu cholesterolu ich skład w stanie cukrzycy.

Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii, Biochemii i Fizjologii Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Pizie, Włochy

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**, Franco Martelli, Michelle Ducci. Influence of cholestyramine and sunflower oil on the content of plasma bile salts and lipoprotein

composition in alloxan induced diabetes in rabbits. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, DD Medicina Veterinaria* 2001 Vol. 56 s. 29-37.

Wspomniany już wcześniej i podkreślany w wielu pracach „cholestatyczny” wpływ hiperglikemii, jest często przyczyną nadmiernej produkcji ROS, które zmieniają aktywność endogennej obrony antyoksydacyjnej. Rozwijając swoje umiejętności analityczne opanowałam metodę oznaczania ubichinonu Q10 metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), którą wykorzystałam do oceny endogennej obrony antyoksydacyjnej wątroby owiec w przebiegu doświadczalnie wywołanej hiperglikemii. W celu pozyskania żółci, u owiec przeprowadziłam zabiegi chirurgiczne polegające na założeniu drenu silikonowego do przewodu żółciowego wspólnego oraz standardowej kaniuli T do dwunastnicy. Po ustaleniu, zarówno dren jak kaniulę wyprowadziłam poza powłoki brzuszne i połączyłam, uzyskując w ten sposób sztuczny przepływ żółci do dwunastnicy w okresach między doświadczeniami. W celu ustabilizowania sekrecji żółci podawałam zwierzętom dodwunastniczo taurocholan sodu. Jedna z grup doświadczalnych otrzymywały dożylnie glukozę, podczas gdy w drugiej grupie infuzja glukozy poprzedzana była podaniem cholinergicznym oraz adrenergicznym blokerów tj. propranolol, phentolamina i atropina). Miało to na celu czasowe zablokowanie widzialnia insuliny. Analizując objętość wydzielanej żółci oraz zawartość kwasów żółciowych, stwierdziłam, że hiperglikemia znacząco obniża oba te parametry. Efekt ten było widać wyraźnie w grupie z wywołaną blokerami hypoinsulinemią. Blokada wydzielania insuliny nie miała natomiast wpływu na poziom wydzielanego do żółci ubichinonu Q10. W obu grupach otrzymujących glukozę, cholestazie towarzyszyło znamienne podwyższenie wydzielania do żółci ubichinonu Q10, którego ilość utrzymywała się na podobnie wysokim poziomie. Wskazywać to może na nasiloną generację ROS w stanach obniżonej sekrecji żółci. Należy jednak zaznaczyć, że poziom Q10 w żółci chociaż wysoki, wraz z czasem doświadczenia malał, co pozwoliło mi stwierdzić, że ten endogenny rozpuszczalny w tłuszczach antyoksydant, tylko czasowo zapobiega rozwijającemu się w stanach cholestazy stresowi oksydacyjnemu, w przebiegu którego generowane ROS prowadzą do osłabienia obrony antyoksydacyjnej wątroby. Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii, Biochemii i Fizjologii Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Pizie.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, F. Marcinelli, Angelo Gazzano. The response of bile secretion and ubiquinone Q10 to hyperglycaemia in sheep. *Pol. J. Vet. Sci.* 2003 Vol. 6 No. 3 s. 183-188.

Oraz w doniesieniach zjazdowych:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, Urszula Kosior-Korzecka, Michelle Ducci. „The Response of bile secretion and Ubiquinone Q10 on hyperglycemia in sheep. J. Physiol. Pharmacol. 2002 Vol. 53 Suppl. 1 S. 99, XXII Congress Of The Polish Physiological Society ; September 4-7th, 2002, Bydgoszcz, Poland.
2. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, K. Borowska, Cezary Kowalski. „Zmiany w wydzielaniu ubichinonu Q10 i witaminy E w żółci w przebiegu stresu oksydacyjnego wątroby u owiec.” XII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych. Nauka praktyce. [t.] 1. Streszczenia. Warszawa, 2004, 15-17 września s. 172, wydaw. SGGW, 2004, 83-7244-539-7.

Stres oksydacyjny włączony w zaburzenia funkcjonowania wątroby przebiegające z cholestazą był tematem mojej kolejnej pracy, w której analizowałam wpływ podawanych owcom glikokortykoidów na sekrecję żółci oraz zawartego w niej cholesterolu i aldehydu dwumalonowego, jako wskaźnika stresu oksydacyjnego. Przy stosowaniu terapii glikokortykoidami należy brać pod uwagę ich udział w uszkodzeniach wątroby na tle ROS, które nasilając peroksydację lipidów błon komórkowych hepatocytów prowadzą min. do nieprawidłowości w transporcie kwasów żółciowych a w konsekwencji do cholestazy. Jako czynnika modulującego szkodliwy wpływ zastosowanego w doświadczeniu hydrokortyzonu, użyłam witaminy C, silnego nieenzymatycznego antyoksydantu. Ekspozycja zwierząt na witaminę C znosiła hamujący wpływ hydrokortyzonu dając w rezultacie wzrost wydzielania żółci. W warunkach indukowanego hydrokortyzonem stresu obserwowałam istotny wzrost zarówno stężenia jak i wydzielania MDA do żółci. Dodatek witaminy C obniżał oba te parametry. Z kolei jednocześnie z istotnym spadkiem poziom cholesterolu w warunkach podawania witaminy C, obserwowałam wzrost jego wydzielanie do żółci. Równoczesne zmiany poziomu aldehydu dwumalonowego jak i cholesterolu w żółci pod wpływem podawanego kwasu askorbinowego wskazują, iż jest on czynnikiem ochraniającym wątrobę w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego podawaniem hydrokortyzonu. Praca została wykonana we współpracy z Kliniką Chirurgii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, Piotr Silmanowicz. „Changes of bile secretion and liver peroxydation under influence of glicocortycoids in sheep. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, DD Medicina Veterinaria 2005 Vol. 60 s. 132-140.

Mając na względzie modulujący wpływ estrogenów na metabolizm glukozy, w kolejnej swojej pracy przeprowadziłam test tolerancji glukozy u anestralnych owiec poddanych działaniu 17- β estradiol (E2). Pięciodniowe domięśniowe podawanie E2 spowodowało istotnie statystyczny ($p \leq 0,05$) wzrost poziomu tego hormonu w osoczu krwi do wartości maksymalnej

125,88 ± 2,96 pg/ml. Jak należało się spodziewać, dożylne podanie roztworu glukozy zwierzętom kontrolnym zwiększyło już w 10-tej minucie infuzji, osoczowy poziom tego cukru z następowym wzrostem stężenia insuliny. W grupie doświadczalnej otrzymującej E2 znaczący wzrost stężenia glukozy obserwowałam dopiero w 30 minucie testu. Znaczącej hiperglikemii, utrzymującej się przez kolejne 90 minut doświadczenia, towarzyszyło zmniejszone w porównaniu do kontroli wydzielanie insuliny.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, Michał Klimont, Elżbieta Tusińska. „Effect of 17beta-estradiol on glucose tolerance and plasma insulin concentration in anestrual sheep” Electron. J. Pol. Agric. Univ. 2005 Vol. 8 issue 4 Ser. Veterinary Medicine s. 33.

5.2 Znaczenie wartości luki anionowej w doświadczalnie indukowanych zaburzeniach równowagi kwasowo-zasadowej u królików.

Zasadę wyliczania i znaczenie wartości luki anionowej (anion gap) LA, wprowadzono po wykazaniu niedoskonałości równania Hendersona-Hasselbacha służącego do określania wartości pH osocza oraz składu podstawowego buforu krwi jakim jest bufor węglanowy. Wartość LA zależna jest od zmian w tzw. nietlotnych, nieoznaczonych anionów kwasowych, do których należą, albuminy osocza, mleczany, β -OH maślan, fosforany i siarczyny. Gdy poziom białek osocza pozostaje niezmienny, przyczyną zmian wartości LA są wymienione aniony. Ponieważ LA pozwala ocenić zaburzenia RKZ, w swojej pracy postanowiłam prześledzić zmiany tego parametru w dwóch przeciwstawnych odchyleniach RKZ, wywołanych podawaniem furosemidu (zasadowica) i NH_4Cl (kwasica) u królików. Pełna analiza gazometryczna oraz stężenie elektrolitów oceniałam w kilku punktach czasowych (30, 60, 90 i 120 min) po podaniu preparatów, w których to punktach następowały zmiany w składzie elektrolitów osocza krwi. Kierunek przesunięć elektrolitów pozostawał odmienny, w efekcie LA po furosemidzie rosła, zaś po podaniu chlorku amonu spadała. Wzrost LA w alkalozie wywołanej Furosemidem zachodził głównie na drodze obniżenia stężenia jonów Na^+ i Cl^- . Z kolei efektem podawania NH_4Cl jest hyperchloremia i związana z tym niska wartość LA. Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii, Biochemii i Fizjologii Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Pizie, Włochy

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**, Franco Martelli, Elżbieta Tusińska. „Zmiany luki anionowej indukowane NH_4Cl i furosemidem u królików (Changes in the anion gap induced by NH_4Cl and furosemide in rabbits). Med. Weter. 2002 r. 58 nr 6 s. 456-461.

Oraz w doniesieniach zjazdowych:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec, Urszula Kosior-Korzecka. Zmiany luki anionowej w doświadczalnie wywołanych zaburzeniach równowagi kwasowo-zasadowej u królików. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, dd Medicina Veterinaria 2000 vol. 55/a s. 104, XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych - Lublin, 21-23 Września 2000.

Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia dr. nauk weterynaryjnych

5.3 Kontynuacja badań nad dysfunkcjami wątroby przebiegającymi z cholestazą u owiec.

Zaburzenia cholestatyczne wymagają szybkiej interwencji terapeutycznej. Naturalne cholagogi jakimi są sole żółciowe, niestety dają szereg objawów ubocznych, do których zalicza się hemolizę krwi czy stany świądowe. Dlatego poszukuje się innych pobudzających wydzielanie żółci preparatów, do których zlicza się menbuton, pochodną naftalenową dostępną jako preparat handlowy o nazwie Vetahepar (VH). W przeprowadzonych na kaniulowanych do dwunastnicy i przewodu żółciowego wspólnego owcach, określałam wydzielanie żółci i kwasów żółciowych pod wpływem dożylnego (12 mg/kg.m.c) i doustnego podania (7,5; 20; i 37,5 mg/kg m.c.) VH. Całkowite stężenie soli żółciowych w zebranych próbkach żółci oznaczałam metodą enzymatyczną natomiast stężenie menbutonu w osoczu krwi metodą HPLC z detekcją UV w zakresie 220 nm.

Najsilniejsze działanie choleretyczne, rozpoczynające się już po 15 minutach, obserwowałam po doustnym podaniu Vetaheparu. Wzrost objętości wydzielanej żółci poprzedzało wzmożenie wydzielania soli żółciowych do żółci. Taki rodzaj odpowiedzi wskazuje, że stymulowana VH cholereza, była następstwem najpierw relaksacji naczyń wątrobowych a następnie nasilającego się wydzielania soli żółciowych. Należy podkreślić, że nasze wyniki jednoznacznie wskazują, że największe wydzielanie żółci pod wpływem VH miało miejsce w warunkach tylko 50 % powrotu żółci do dwunastnicy. Podkreśla to przydatność stosowania VH w zaburzeniach wątroby przebiegających ze znaczną cholestazą. Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii, Biochemii i Fizjologii Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Pizie, Włochy oraz z polskim producentem leków weterynaryjnych spółką Vet-Agro z Lublina.

Wyniki prac opublikowano w :

1. Ryszard Bobowiec, Jan Głuszak, Franco Martelli, **Marta Wójcik**, Joanna Wessely-Szponder. „Wpływ Vetaheparu na wydzielanie żółci u owiec. Med. Weter. 2007 Vol. 63 Nr 8 s. 979-981.
2. Bobowiec R., **Wójcik M.** 2010,: Choleretyki w zaburzeniach trawienia i chorobach wątroby u bydła. Lecznica Dużych Zwierząt 5, nr 2, 100-105, Monografia-ISBN 978-83-930662-0-9.

5.4 Ocena aktywności proliferacyjnej komórek owalnych izolowanych z nowotworowych i nienowotworowych uszkodzeń wątroby, modulowana β -karotenem i astaxantyną (ASX) *in vitro*.

Poniższe badania realizowane w ramach grantu N N30831669 33, w którym pełniłam funkcję głównego wykonawcy, były moimi pionierskimi badaniami dotyczącymi udziału macierzystych komórek owalnych wątroby w procesie hepatokarcinogenezy. Opierając się na doniesieniach wskazujących karoteny jako istotne czynniki nasilające różnicowanie komórek postanowiłam ocenić te właściwości wobec wyizolowanych nowotworowych i nienowotworowych KO szczura. Po raz pierwszy wykorzystując w swojej pracy badawczej model HP/DEN, izolowałam KO a następnie poddawałam je działaniu β -karotenu (posiadającego aktywność witaminy A) oraz astaxantyny (ASX)-karotenu nie posiadającego aktywności witaminy A. Po 24, 48, 72 godzinach oraz 5, 10 i 15 tygodniach hodowli, w uzyskanym i poddanym elektroforezie lizacie komórek oceniałam metodą Western Blotting ekspresję CD34, albuminy i CK19 markerów typowych odpowiednio dla KO, hepatocytów i cholangiocyty. Na tej podstawie oceniałam wpływ karotenów na proces różnicowania KO. W tym samym czasie analizowałam aktywność proliferacyjną komórek na podstawie testu MTT a w podłożu hodowlanym oznaczono stężenie fibrynogenu i haptoglobiny.

Dodatek do podłoża hodowlanego β -karotenu jak i ASX wzmacniał ekspresję albuminy w komórkach izolowanych od szczurów poddanych działaniu DEN. Wyraźna ekspresja tego typowego dla hepatocytów markera, obserwowana była już w 5-tym tygodniu hodowli i utrzymywała się aż do zakończenia doświadczenia. W tych samych warunkach doświadczalnych nie obserwowałam ekspresji CK19. Komórki izolowane od szczurów poddanych działaniu DEN i inkubowane w warunkach kontrolnych wykazywały największą aktywność proliferacyjną już po 72 godz. ASX znacząco obniżała tę aktywność w 5, 10 i 15 tygodniu doświadczenia. W tych samych warunkach doświadczalnych obserwowałam wysoką, dodatnią korelację pomiędzy aktywnością proliferacyjną komórek a poziomem wydzielanego do podłoża fibrynogenu ($r=0.77$). Obecność karotenów w podłożu hodowlanym nie wpływała znacząco na poziom haptoglobiny, której maksymalne stężenie (0.832 ± 0.25 mg/100 ml) obserwowałam w 10 tygodniu hodowli komórek uzyskanych od szczurów otrzymujących karcinogen.

Uzyskane wyniki uzasadniły stwierdzenie, iż karoteny hamują aktywność proliferacyjną KO jak również nasilają ich różnicowanie. Efekt ten pozostaje niezależny od posiadania przez karoten aktywności prowitaminy A. W obecności karotenów, słabszą proliferację z jednoczesnym nasilonym procesem różnicowania obserwowano zwłaszcza w

hodowlach komórek uzyskanych od szczurów poddanych działaniu karcinogenu. W oparciu o wyraźną ekspresję albuminy oraz brak detekcji cytokeratyny 19, stwierdziłam iż w warunkach *in vitro*, KO różnicują się przede wszystkim do hepatocytów.

Otrzymane w tym doświadczeniu obiecujące wyniki dotyczące możliwości modulowania zarówno proliferacji jak i różnicowania nowotworowych KO, ukierunkowały moje zainteresowania badawcze, których odzwierciedleniem są wyniki opublikowane w pracach zaliczonych do głównego osiągnięcia badawczego.

Wyniki opublikowano w

1. **Wójcik M.**, Bobowiec R., Martelli F.: "Effect of carotenoids on *in vitro* proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic liver injuries in rats" *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008, 59, Supp2, 203-213.
2. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec „Wątrobowe komórki owalne w procesach regeneracji wątroby i hepatokarcynogenezie.. *Życie Wet.* 2012 R. 87 Nr 3 s. 216-220.

Oraz w doniesieniach zjazdowych:

Marta Wójcik, Ryszard Bobowiec, Franco Martelli. Effect of carotenoids *in vitro* proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic liver in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008 vol. 59 suppl. 1 s. 233.

5.5. Ocena równowagi oksydo-redukcyjnej oraz procesu zapalnego w pierwotnych hodowlach szczurzych hepatocytów ekspozowanych na działanie hormonów.

Oprócz działania kontrolnego w reprodukcji, 17 β -estradiol (E2) wywiera znaczący wpływ na wątrobę. Wpływ ten pozostaje zależny od kondycji i gatunku zwierzęcia. Jednak decydującym czynnikiem warunkującym prawidłowy metabolizm E2 do antyoksydacyjnej cząsteczki etynyl estradiolu jest jego osoczowe stężenie. Wykorzystując nabyte umiejętności izolacji komórek wątroby oraz kontynuując rozpoczęte przed doktoratem moje zainteresowania dotyczące 17 β -estradiolu, postanowiłam ocenić odpowiedź hepatocytów *in vitro* na różne stężenia tego hormonu w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego dodatkiem do podłoża hodowlanego jonów Fe³⁺. Odpowiedź hepatocytów analizowałam na podstawie ich żywotności, aktywności proliferacyjnej, wielkości peroksydacji lipidów (MDA) oraz poziomu haptoglobiny jako endogennego przeciwutleniacza. Wysiane do 24-dolkowych płytek komórki hodowałam w podłożu DMEM/HAMS-12 (v/v) bez dodatków (kontrola) z dodatkiem jonów żelaza (100 μ g/100 ml) oraz z dodatkiem Fe³⁺ w połączeniu z malejącymi stężeniami 17 β -estradiolu (roztwory 0.2%, 0.02% i 0.002%). W porównaniu do kontroli, hepatocyty w obecności jonów Fe³⁺ dotknięte zostały stresem oksydacyjnym wyrażonym wzrostem stężenia MDA (0.056 \pm 0.011 nM/ml) jedynie po 48 godz. inkubacji. Niezależnie od stężenia, dodatek E2 do podłoża doprowadzał do obniżenia poziomu aldehydu w pierwszych 48 godzinach hodowli

komórek. Obecność E2 w podłożu hodowlanym znacząco hamowała proliferację hepatocytów, zwłaszcza w ostatnim etapie doświadczenia. W tym samym czasie zarówno same jony żelaza jak również w połączeniu z 17 β -estradiolem istotnie nasilały wydzielanie haptoglobiny.

17 β -estradiol, w każdym z zastosowanych stężeń, hamował peroksydację lipidów jedynie w ciągu pierwszych 48 godzin. Ponadto wraz z upływem czasu hodowli, hormon ten ograniczał proliferację hepatocytów, obniżając tym samym zdolności regeneracyjne wątroby. Wydzielanie haptoglobiny pozostawało niezależne od obecności estrogenu w podłożu hodowlanym.

Innym modulatorem, którego aktywność oceniałam wykorzystując pierwotne hodowle hepatocytów szczura, był deksametazon (DEX), syntetyczny glikokortykoid o działaniu immunosupresyjnym i przeciwzapalnym. Obok wspomnianego działania pełni on znaczącą rolę w regulacji proliferacji i różnicowania komórek wątroby. Z uwagi na to, iż dotychczasowe badania wskazują, zarówno stymulujący jak i hamujący wpływ DEX na proliferację komórek, postanowiłam określić aktywność proliferacyjną hepatocytów w obecności DEX w warunkach *in vitro*. W doświadczeniu wyodrębniłam następujące grupy: kontrola, I – z dodatkiem 10⁻³ M cholesterolu (Ch), II- z dodatkiem 10⁻³ Ch i 10⁻⁶ M DEX , III- z dodatkiem 10⁻³ Ch i 10⁻⁸ M DEX , IV- z dodatkiem 10⁻³ Ch i 10⁻¹⁰ M DEX do pożywki hodowlanej. Oprócz oceny proliferacji hepatocytów, dokonałam rozdziału soli żółciowych w podłożu hodowlanym metodą HPLC z detekcją UV, w układzie faz odwróconych (RP C18, 250 x 4mm, 5 μ m, LiChrospher 100).

Indeks proliferacji hepatocytów inkubowanych jedynie z dodatkiem cholesterolu wahał się od 0.841 \pm 0.05 do 0.937 \pm 0.007. Dodatek do podłoża 10⁻⁶ M DEX istotnie hamował proliferację komórek (0.519 \pm 0.12) po 48 godzinach inkubacji. Podobny hamujący wpływ DEX obserwowałam w warunkach jego najniższego stężenia w podłożu hodowlanym. Wraz z czasem trwania doświadczenia DEX nasilał proliferację hepatocytów do wartości 1.05 \pm 0.05; 0.96 \pm 0.008; 1.06 \pm 0.02 odpowiednio pod wpływem 10⁻⁶M; 10⁻⁸M i 10⁻¹⁰M. Poddanie hepatocytów działaniu cholesterolu powodowało systematyczny wzrost stężenia soli żółciowych w podłożu hodowlanym. Niezależnie od użytej dawki DEX, najwyższe stężenia soli żółciowych utrzymujące się na podobnym poziomie, obserwowane były po 72 godzinach inkubacji i wynosiły 3.97 \pm 1.2 μ M/l (10⁻⁶M); 3.42 \pm 2.0 μ M/l (10⁻⁸M) i 3.52 \pm 0.3 μ M/l (10⁻¹⁰M). Analiza HPLC profilu soli żółciowych, pozwoliła stwierdzić, iż kwas cholowy połączony z tauryną lub glicyną, oraz kwas deoksycholowy skoniugowany jedynie z tauryną stanowią dominujące formy soli żółciowych obecnych w podłożu hodowlanym.

Odpowiedź proliferacyjna hepatocytów jest zależna zarówno od stężenia DEX jak i czasu ekspozycji komórek na jego działanie. Przedłużający się wpływ DEX na hepatocyty nasila proliferację tych komórek, a jego najwyższe użyte w tym doświadczeniu stężenie pobudza syntezę soli żółciowych znacznie wcześniej niż w przypadku innych stężeń.

Wyniki prac opublikowano w:

1. **Marta Wójcik**, Ryszard Bobowiec. Effect of dexamethasone on proliferation of rat hepatocytes and release of bile acids in vitro. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2011 vol. 55 no. 2 s. 327-331.
2. **Marta Wójcik**, Urszula Kosior-Korzecka, Ryszard Bobowiec. Cytoprotective action of 17 β -oestradiol against iron-induced hepatic oxidative stress in vitro. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2010 vol. 54 no. 2 s. 259-263,

5.6 Aktywność metaboliczna i wzajemne oddziaływanie różnych typów komórek wątroby w warunkach stosowania wysokotłuszczowej diety ketogennej.

Wysokotłuszczowa dieta ketogenna (KD) stosowana jest coraz częściej zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej, jako sposób zapobiegania i łagodzenia objawów padaczkowych i zmian neurodegeneracyjnych. Wprowadzenie jednak tego rodzaju diety wymaga dokładnego określenia jej wpływu na czynność wątroby, która ma znaczący udział w metabolizmie lipidów (synteza, wychwytywanie, magazynowanie, utlenianie). Zdolność KD do wywoływania zmian metabolicznych w wątrobie sprawia, że może ona przyczyniać się do modulacji komórek gwiaździstych wątroby (HSC), które w warunkach fizjologicznych są magazynem związków lipidowych zwłaszcza retinolu, natomiast patologicznie pobudzone biorą udział w zwłóknieniu wątroby. Wprawdzie wykazano już negatywne konsekwencje żywienia KD, wśród których są zmiany w wątrobie, odpowiadające niealkoholowemu stłuszczeniu wątroby (NAFLD), nikt jednak nie badał aktywności komórek HSC w warunkach żywienia tą dietą. Dlatego wykonane przeze mnie badania opierały się na ocenie aktywności komórek gwiaździstych wyizolowanych z wątroby szczurów żywionych KD. Dla porównania zmian o charakterze zwłóknienia w jednej z grup szczurów użyto tioacetamidu, podawanego w wodzie do picia, jako modelowego czynnika wzmagającego procesy zwłóknienia wątroby. Opierając się na dostępnej literaturze, stwierdziłam, że hormony płciowe zwłaszcza estrogeny mogą modulować odpowiedź ze strony HSC, zarówno w grupie szczurów otrzymujących KD jak i tioacetamid wyodrębniono zwierzęta nieowarietomizowane, owarietomizowane, oraz poddane owarietomii z jednoczesnym podawaniem estradiolu (E2). Badając poziom kolagenu typu I i α SMA (smooth muscle actin α) stwierdziłam, że ekspozycja komórek HSC na KD nasila syntezę i uwalnianie w/w składników macierzy zewnątrzkomórkowej, które włączone są

w proces zwłóknienia wątroby. Ponadto w takich warunkach zmieniała się radykalnie morfologia wyizolowanych i hodowanych HSC, które pozbywając się cytoplazmatycznych kropli tłuszczu, stawały się komórkami przypominającymi miofibroblasty. Ta typowa uzyskana przeze mnie w warunkach *in vitro* transformacja HSC, odzwierciedla zmiany jakie mają miejsce w wątrobie pod wpływem KD. Według wyników uzyskanych przez innych autorów, podczas żywienia KD, większość zdrowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych kierowane jest do mózgu, natomiast bardziej szkodliwe formy transportowane są do wątroby, i to one mogą być czynnikiem pobudzającym HSC. Nie można również pominąć faktu, że niedobór 3-n długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LCPUFA) oraz wzrost proporcji kwasów tłuszczowych 3-n/6-n powoduje, narastający wychwyty wątrobowy tych kwasów i w konsekwencji obniżoną β -oksydację. W kolejnym etapie dochodzi do nadprodukcji ROS, które poprzez peroksydację lipidów oraz nasilone wydzielanie cytokin prozapalnych promują stłuszczenie, zwłóknienie i w końcowym etapie marskość wątroby. W naszych badaniach HSC izolowane od szczurów „ketogennych” wytwarzały znacznie więcej cytokiny prozapalnej TGF- β 1 (transforming growth factor β 1), której ilości dodatnio korelowały z ilością kolagenu typu I, uwalnianego do podłoża hodowlanego. Wykazałam również, że ta pozytywna korelacja widoczna była zwłaszcza u szczurów owariektomizowanych żywionych KD. Wprawdzie podanie E2 hamowało indukowaną przez KD transformację komórek HSC do miofibroblastów oraz obniżało wydzielanie TGF- β 1, z jednoczesną niższą produkcją białek macierzy zewnątrzkomórkowej, ale nie było to działanie znaczące.

Ze względu niewielką ilość badań oceniających wpływ KD na komórki gwiaździste jak również hepatocyty, przeprowadzone przeze mnie badania dotyczyły również wpływu tego specyficznego żywienia na proliferację obu typów komórek oraz poziom uwalnianych przez nie rodników tlenowych. Wykazałam, że o ile KD obniża w czasie proliferację hepatocytów, to nasila ją w sposób znaczący w stosunku do komórek HSC. Ponadto z uwagi na wysoką zawartość tłuszczów w KD, poszerzyłam swoje doświadczenia o porównanie profilu kwasów tłuszczowych oznaczonych metodą chromatografii gazowej (GC) w osoczu szczurów żywionych dietą ketogenną w stosunku do karmy standardowej. Pod wpływem KD wszystkie analizowane kwasy tłuszczowe osiągnęły wyższe stężenia, niż w osoczu szczurów żywionych dietą standardową, a najwyższe stężenia osiągał kwas linolenowy i palmitynowy. To z kolei wywoływało stres oksydacyjny, zarówno w hepatocytach, jak i komórkach gwiaździstych. W ostatnim 12 tym dniu inkubacji obserwowałam wzmożone wytwarzanie tlenu azotu i anionu nadadtlenkowego.

Wyniki badań opublikowano w:

1. Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**, Jadwiga Jaworska-Adamu, Elżbieta Tusińska. Fibrogenic response of hepatic stellate cells in ovariectomised rats expose to ketogenic diet. *J. Physiol. Pharmacol.* 2013, vol. 64, no 1 19-26.
2. **Marta Wójcik**, Joanna Wessely-Szponder, Urszula Kosior-Korzecka. Proliferative and oxidative response of hepatocytes (hep) and hepatic stellate cells (hsc) isolated from rats exposed to ketogenic diet. *Pol. J. Vet. Sci.* 2014 vol. 17 no. 4 703-711.

Oraz doniesieniach zjazdowych:

1. Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**, Mario Giorgi, Jadwiga Jaworska-Adamu. Influence of ovariectomy and 17β - oestradiol on fibrogenic activity of rat liver stellate cells exposed to ketogenic diet. *Physiol. Pharmacol.* 2011 vol. 62 suppl. 1 s. 189
2. Izabela Krakowska, Grzegorz Lonc, Małgorzata Matysek, **Marta Wójcik**. Influence of hyperlipidemic diet on hippocampal estrogens receptor expression in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011 vol. 62 suppl. 1 s. 193.
3. Izabela Krakowska, Grzegorz Lonc, Małgorzata Matysek, **Marta Wójcik**., Estrogen receptors α expression in neurons of the lateral nucleus of the amygdala in female rats after ketogenic diet administration. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: from labs to clinics - common aim, various techniques: with satellite symposium: modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance., 4-6 September 2013, Olsztyn. 64. Wrocław, Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, 2013, 978-83-61216-69-8.
4. Małgorzata Matysek, Izabela Krakowska, Grzegorz Lonc, **Marta Wójcik**, Iwona Łuszczewska-Sierakowska Immunodetection of estrogen receptors alpha within claustrum in ovariectomised female rats after ketogenic diet administration., XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: from labs to clinics - common aim, various techniques :with satellite symposium: modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance. 4-6 September 2013, Olsztyn. 72. Wrocław, Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, 2013; 978-83-61216-69-8.
5. Grzegorz Lonc, Izabela Krakowska, Małgorzata Matysek, **Marta Wójcik**, Influence of a ketogenic diet on the expression of α in neurons of ovariectomised female rats in the basolateral complex of the amygdala. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: from labs to clinics - common aim, various techniques :with satellite symposium: modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance. 4-6 September 2013, Olsztyn. 69. Wrocław, Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, 2013, 978-83-61216-69-8.

5.7 Analiza wybranych parametrów w doświadczalnie indukowanych oraz klinicznych zaburzeniach równowagi kwasowo-zasadowej u zwierząt.

Jednym z głównych kierunków mojej pracy badawczej, rozpoczętym przed obroną doktoratu i kontynuowanym do chwili obecnej jest ocena zaburzeń równowagi kwasowo - zasadowej w przebiegu biegunek u cieląt oraz w cyklu produkcyjnym indyków. Ponadto u tego gatunku zwierząt jak i u ciężarnych owiec wykorzystywałam manipulacje różnicy kationowo-anionowej paszy (PRKA), do oceny RKZ.

Biegunki cieląt szeroko i opisowo odzwierciedlają stan zaburzeń wodno-elektrolitowych przewodności pokarmowej, w wyniku których dochodzi zwykle do ciężkiej kwasicy

metabolicznej wymagającej specyficznej terapii. Kwasica metaboliczna w przebiegu biegunki jest następstwem działania trzech zasadniczych mechanizmów patologicznych: utraty HCO_3^- w jelitach, przedostawania się z jelit kwasów organicznych, głównie formy D kwasu mlekowego oraz odwodnienia powodującego osłabienie przepływu krwi przez nerki, zmniejszającego wydalanie jonów H^+ i pogłębiającego stan kwasicy. Z uwagi na powyższe zależności oraz rozbieżności dotyczące udziału izoform L^+ i D^- kwasu mlekowego w rozwoju kwasicy, postanowiłam określić w jakim stopniu poszczególne enancjomery wpływają na rozwój tego zaburzenia u cieląt z objawami biegunki. W tym celu przeprowadziłam ilościową i jakościową analizę obu form optycznych kwasu mlekowego z wykorzystaniem metody HPLC z kolumną chiralną (50 x 4.6 mm I.D, Chiral Pak MA+, detektor UV). Ponadto, aby określić charakter i zakres kwasicy metabolicznej analizowałam lukę anionową (LA), użyteczny i prognostyczny parametr w kwasicach metabolicznych. Nowonarodzone cielęta zakwalifikowałam do trzech grup: I - cielęta zdrowe (kontrola), II - cielęta z łagodnym przebiegiem biegunki i III- cielęta z ciężkim przebiegiem biegunki. W grupach zwierząt dotkniętych biegunką, pH krwi obniżało się wraz z narastaniem objawów klinicznych. Ponadto jedynie u tych cieląt, wykazałam dominację formy D^- kwasu mlekowego w osoczu krwi, którego stężenie wynosiło $1.82 \pm 0.54 \text{ mM/l}$ i $4.74 \pm 1.89 \text{ mM/l}$ odpowiednio w II i III grupie zwierząt. Wartość LA u cieląt z objawami biegunki utrzymywała się na wyższym poziomie niż u zwierząt zdrowych. Jednakże, tylko w III grupie stwierdzono istotnie statystyczny wzrost wartości LA do $27.03 \pm 1.26 \text{ mEq/l}$. Dodatnia współzależność pomiędzy wysokim stężeniem D^- izoformy LA, a wysoką wartością LA, pozwala stwierdzić, że głównym powikłaniem biegunek nowonarodzonych cieląt jest kwasica D-mleczanowa.

Wartość LA oraz innych parametrów RKZ oceniałam również u owiec, w ostatnim trymestrze ciąży. W tym czasie dochodzi niejednokrotnie do pojawiania się stanu toksemii, której towarzyszy osoczowy wzrost stężenia ciał ketonowych oraz kwasica metaboliczna. Ponieważ różnica kationowo-anionowa paszy (RKAP) może wpływać na równowagę kwasowo-zasadową osocza, postanowiłam ocenić zmiany w RKZ oraz określić niektóre parametry reprodukcyjne u ciężarnych owiec żywionych paszą o różnej RKAP. Obie użyte w naszym doświadczeniu pasze charakteryzowały się dodatnimi, jednakże różniącymi się zasadniczo wartościami RKAP. W grupie owiec żywionych paszą o wysokim wskaźniku RKAP ($+214.5 \text{ mEq/kg s.m.}$) pH krwi było wyższe w porównaniu do owiec żywionych paszą o niskim wskaźniku ($+46.2 \text{ mEq/kg s.m.}$). W warunkach podawania paszy o wysokiej RKAP, LA wzrastała do $19.6 \pm 2.62 \text{ mEq/l}$, podczas gdy luka mocnych jonów (SIG) przyjmowała

wartości ujemne. W grupie otrzymującej paszę z niską RKAP, SIG osiągało wartość dodatnią (3.43 ± 0.55 mEq/l) w 16-tym i 17-tym tygodniu ciąży. W tej grupie owiec średnia wielkość miotu urodzeniowego była wyższa i wynosiła 1.29 ± 0.7 . Uzyskane wyniki, pozwoliły stwierdzić, że dobór odpowiedniej wartości różnicy kationowo-anionowej paszy, wpływa nie tylko na parametry równowagi kwasowo-zasadowej owiec ale również poprawia parametry reprodukcyjne.

Zmienność PRKA wykorzystałam również do oceny RKZ oraz przyrostów masy ciała indyków żywionych paszą z dodatkiem kiszonki kukurydzianej (CS). Zależnie od sposobu żywienia indyki podzielono na 5 grup: A (kontrola) : pasza standardowa (SD) (60%) plus CS (40%); B: SD (60%), CS (40%) plus 240g CaCl_2 /100kg paszy; C: SD (60%), CS (40%) plus 480g CaCl_2 /100kg paszy; D: SD (60%), CS (40%) plus 240g NaHCO_3 /100kg paszy; E: SD (60%), CS (40%) plus 480g NaHCO_3 /100kg paszy. W porównaniu do grupy kontrolnej, dodatek CaCl_2 powodował wysokie ujemne wartości PRKA. Z kolei suplementacja NaHCO_3 zwiększała wartość PRKA. Masa ciała indyków żywionych paszą zawierającą jedynie dodatek CS, pozostawała na niższym poziomie przez okres całego doświadczenia. Oczekiwane przez nas zmiany parametrów LA i poziomu jonów HCO_3^- , wiązały się z przyrostami masy ciała (BWG) indyków na każdym etapie żywienia, niezależnie od alkalizacji (NaHCO_3) czy zakwaszenia (CaCl_2) paszy.

Wyniki prac opublikowano w:

1. Kamil Gruszczyński, Waclaw Strobel, **Marta Wójcik**, Urszula Kosior-Korzecka, Joanna Wessely-Szponder, Ryszard Bobowiec "Growth rate and acid-base balance in turkeys fed a silage-containing diet modified by different dietary cation-anion difference." *Med. Weter.* 2017 vol. 73 nr 12 s. 786-791,
2. **Marta Wójcik**, Urszula Kosior-Korzecka, Ryszard Bobowiec. „Contribution of L+ and D- lactic acid to metabolic acidosis during neonatal calf diarrhea.” *Med. Weter.* 2010 Vol. 66 Nr 8 s. 547-550,
3. **Marta Wójcik**, Franco Martelli, Ryszard Bobowiec, Krzysztof Patkowski, Agnieszka Chałabis-Mazurek, Grażyna Wałkuska. "Influence of diet cation-anion difference (DCAD) on plasma acid-base status in pregnant sheep. *Med. Weter.* 2009 Vol. 65 Nr 10 s. 679-682.
4. Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**. Zespół biegunkowy u cieląt. *Mag. Wet.* 2010 Vol. 19 nr 4 s. 322-327.
5. Bobowiec R., **Wójcik M.** 2011.; Neonatalny zespół biegunkowy cieląt. *Lecznica Dużych Zwierząt*, 6, nr 2, 15-26. Monografia-ISBN 978-83-930662-1-6,

Oraz w doniesieniach zjazdowych:

1. **Marta Wójcik**, Urszula Kosior-Korzecka, Ryszard Bobowiec. Zmiany osoczowego stężenia formy D(-) kwasu mlekowego w przebiegu biegunek u nowonarodzonych cieląt. od nauki do praktyki : XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 18-20 września 2008. Olsztyn, UWM, 2008. - s. 443.

2. **Marta Wójcik**, Kamil Gruszczyński, Ryszard Bobowiec. „Response of growth rate and small intestinal morphology in turkey exposed to corn silage composed diet with different DEB International Conference "Current Approaches To Health And Diseases In Animals And Humans", Lublin, September 19-20, 2014 47. Lublin, Wydawnictwo "Morpol", 978-83-940360-0-3 2014.

5.8 Wykorzystanie ubichinonu Q10 jako wskaźnika obrony antyoksydacyjnej w okresie wczesnej laktacji u owiec

Dla samicy okres wczesnej laktacji jest czasem zwiększonego zapotrzebowania energetycznego, obserwowanego szczególnie u owiec z większą liczbą jagniąt oraz z ewentualnymi zaburzeniami poporodowymi. Występuje wówczas adaptacyjny, zwiększony przepływ krwi przez wątrobę, rośnie zużycie tlenu oraz tempo przemian metabolicznych, co pociąga za sobą nadmierną generację wolnych rodników tlenowych. Biorąc pod uwagę powyższe zmiany oznaczyłam parametry stresu oksydacyjnego oraz wskaźniki określające funkcjonowanie wątroby w okresie laktacji u owiec rasy PON, u których stwierdzono poporodowe wypadanie pochwy. Dodatkowym czynnikiem branym przeze mnie pod uwagę była liczba urodzonych jagniąt. W uzyskanym osoczu krwi oznaczałam poziom Q10 metodą HPLC oraz poziom MDA i glukozy metodą spektrofotometryczną. W grupie owiec z zaburzeniami poporodowymi stwierdzono niższe ($p \leq 0,05$) stężenie Q10 w porównaniu do owiec zdrowych. Obserwowałam to zwłaszcza u samic z bliźniaczym potomstwem. W tej samej grupie, osoczowy poziom kwasów żółciowych osiągał wartości $141,79 \pm 16,52 \mu\text{M/l}$. Uzyskane przez mnie wyniki wskazują, iż u owiec, które urodziły więcej niż jedno jagnię i mają komplikacje poporodowe, nasilony stres oksydacyjny jest przyczyną zaburzeń funkcji wątroby.

Wyniki opublikowano w pracy:

Wójcik Marta, Ryszard Bobowiec, Ewa Ćwiok „Changes Of Hepatic And Oxidative Stress Parameters During Early Lactation In Sheep With Postpartum Disturbances” Acta Sci. Pol. Med.Wet. 2006, vol.5 No1, 117-125.

5.9 Analiza poziomu Q10 w tkance mięśniowej królików, pod kątem wykorzystywania mięsa króliczego jako źródła ubichinonu w żywieniu ludzi.

U ludzi, w wielu stanach chorobowych dochodzi do obniżenia stężenia koenzymu Q₁₀. W wyniku interakcji z lekami jego stężenie we krwi może ulec obniżeniu nawet o 40%. Postępowanie terapeutyczne w takich przypadkach polega na suplementacji koenzymu w postaci preparatów farmaceutycznych lub bogatych w koenzym Q₁₀ produktów spożywczych. Koenzym Q₁₀ występuje w większości produktów żywnościowych, jednak w zróżnicowanych ilościach. Mięso z królika uznawane jest za dobre źródło łatwo dostępne, wysokiej jakości i użyteczne biologicznie białko, ale nie ma informacji na temat zawartości CoQ₁₀ w tkankach

królika. Celem naszych badań było określenie poziomu CoQ₁₀ oraz białka całkowitego w tkance mięśniowej królików żywionych w sposób tradycyjny oraz paszami przemysłowymi. Ubichinon Q₁₀ oznaczałam w wybranych partiach mięśniowych mięsa króliczego, metodą HPLC a końcowe stężenie Q₁₀ obliczałam wg. Wzoru: $C_p = C_s/A_s \times A_p$, gdzie C_p- stężenie Q₁₀ w tkance C_s – stężenie standardu; A_s – pole powierzchni pików standardu; A_p – pole powierzchni pików badanej próbki. Badania wykazały wpływ sposobu żywienia i chowu na poziom ubichinonu Q₁₀ w tkance mięśniowej królików. Istotnie wyższą zawartość Q₁₀ występowała w tkance mięśniowej królików z przydomowych hodowli określanych jako „chów ekologiczny”. Najwyższy poziom CoQ₁₀ stwierdzono w combrze, w który zawartości białka była również najwyższa.

Praca została wykonana we współpracy z Katedrą Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydz. Med. Wet. UP w Lublinie.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Krzysztof Szkucik, Renata Pysz-Łukasik, **Marta Wójcik**, Michał Gondek. “Ubiquinone Q₁₀ and protein contents in rabbit meat in relation to primal cut and rearing system. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2013 vol. 57 nr 1 107-111.

Oraz doniesieniach zjazdowych:

1. Renata Pysz-Łukasik, Krzysztof Szkucik, **Marta Wójcik**. „Poziom ubichinonu Q₁₀ w mięsie królików. XIV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Wrocław 13-15 IX 2012 s. 564, bibliogr. Wrocław, wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, 2012, 978-83-7717-104-2.

5.10 Badania regulacji wydzielania gonadotropin przez komórki przysadki gruczołowej *in vitro* świń i owiec.

Swoje zainteresowania naukowe, poszerzałam w ramach zespołu badawczego, który zajmował się regulacją wydzielania gonadotropin przez komórki przysadki gruczołowej świń i owiec.

W jednej z prac wskazano na dodatnią korelację między wzrastającymi stężeniami 2-metoksyestradiolu (2-ME) (10-11-10-7M) a wydzielaniem FSH ($r = 0,72, 0,95, 0,92, 0,90, 0,85$ i $0,82$, odpowiednio po 2, 6, 18, 24, 48 i 72 godz. przez komórek przysadki gruczołowej świń. Głównym czynnikiem pośredniczącym w oddziaływaniu 2-ME na sekrecję FSH jest anionorodnik ponadtlenkowy.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Urszula Kosior-Korzecka, Paulina Radwańska, **Marta Wójcik**. Effect of 2-methoxyestradiol on gonadotropin secretion and oxidative status of porcine pituitary cells in vitro. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012 vol. 56 nr 3 373-378.

W kolejnej pracy próbowano naświetlić, oddziaływanie kisspeptyny-10 (KiSS-10) na wydzielanie FSH przez komórki przedniego płata przysadek tryczków *in vitro*. Dowiedziono, że wydzielanie FSH jest uzależnione od stężenia KiSS-10 w podłożu oraz od czasu ekspozycji komórek na kisspeptynę. KiSS-10 w stężeniach 10^{-11} – 10^{-9} M powoduje wzrost wydzielania FSH ($r= 0,73, 0,90, 0,82$, odpowiednio po 6, 12 i 48 godz.), zarówno w odniesieniu do kontroli ujemnej, jak i dodatniej, natomiast w stężeniu 10^{-8} M obniża sekrecję tej gonadotropiny. Równoczesna ekspozycja komórek na antagonistę receptorów GPR54 (peptyd 234) znosi stymulujący efekt KiSS-10. Potwierdza to, bezpośrednie oddziaływanie kisspeptyn na komórki przedniego płata przysadki mózgowej tryczków odnośnie wydzielania hormonu folikulotropowego.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Urszula Kosior-Korzecka, Paulina Radwańska, Katarzyna Witkowska, Krzysztof Patkowski, **Marta Wójcik**, Joanna Wessely-Szponder, Ryszard Bobowiec „Kisspeptin-10 and peptide 234 modulate gnRH-induced follicle-stimulating hormone secretion from anterior pituitary cells of prepubertal lambs *in vitro*.” *Med. Weter.* 2014 vol. 70 nr 10 599-603.

5.11 Badania dotyczące zależności pomiędzy otyłością matki w okresie ciąży a statusem hormonalnym i tempem wzrostu potomstwa we wczesnym okresie postnatalnym.

Następnym kierunkiem moich zainteresowań badawczych było wyjaśnienie hormonalnych podstaw mniejszego tempa wzrostu jagniąt pochodzących z ciąży mnogich. Uzyskane wyniki wskazały na istotnie statystycznie wyższe stężenia somatotropiny ($P \leq 0,001$), insuliny ($P \leq 0,001$) i glukozy ($P \leq 0,05$) oraz znacząco obniżony poziom IGF-1 ($P \leq 0,001$) u jagniąt o zmniejszonej masie ciała pochodzących z ciąży trojaczych. Stwierdzono również odmienne zależności między stężeniem somatotropiny i IGF-1 w osoczu a tempem wzrostu jagniąt – trojaczków w porównaniu do jagniąt pochodzących z mniej licznych miotów.

Wyniki opublikowano w pracy:

1. Urszula Kosior-Korzecka, Krzysztof Patkowski, Ryszard Bobowiec, **Marta Wójcik**, Elżbieta Tusińska. “Sustained opposite relationships between anabolic hormones in preweaning triplet lambs born to obese mothers.” *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012 vol. 56 no. 1 s. 109-114.

5.11 Wpływ stresu transportowego na modulację odpowiedzi zapalnej u koni

Najnowsze badania wskazują na narastanie zmian zapalnych podczas transportowej reakcji stresowej, z uwalnianiem z mięśni szkieletowych miokina, zwłaszcza IL-6, IL-8 i adiponektyny. W badaniach przeprowadzonych u koni zimnokrwistych wykazaliśmy, dodatnią współzależność pomiędzy poziomem uwolnionych miokina a czasem trwania stresu

transportowego, co było wyraźnie widoczne u osobników starszych. Ponadto, opierając się na podwyższonym poziomie fibrynogenu, jako białka ostrej fazy, oraz fosfokinazy kreatynowej i aminotransferazy aspartamowej, jako markerów uszkodzeń mięśni szkieletowych, wskazano transportowe uszkodzenie mięśni szkieletowych jako przyczynę uogólnionej odpowiedzi zapalnej. Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Wydz. Med. Wet. UP w Lublinie.

Wyniki opublikowano w pracach:

1. Wessely-Szponder J., Bełkot Z., Bobowiec R., **Wójcik M.**, Kosior Korzecka U. 2014. Crosstalk between adiponectin and cytokines (IL-6 and IL-8) during transportation stress in horses *Medycyna Weter.* (70), 546-549.
2. Wessely-Szponder J., Bełkot Z., Bobowiec R., Kosior-Korzecka U., **Wójcik M.** 2015. Transport induced inflammatory responses in horses *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 18, No. 2 , 407–413.

Podsumowanie dorobku naukowego

Wg wykazu Biblioteki Głównej UP w Lublinie z dnia 9.11.2018 r, mój dorobek naukowy obejmuje 34 publikacje, w tym 18 prac oryginalnych znajdujących się w bazie JCR (5 zaliczonych do osiągnięcia naukowego), 13 prac znajdujących się części B wykazu MNiSW, 2 monografie i jedna praca wymieniona w punkcie inne. (Zał. nr 3, wykaz prac z Biblioteki Głównej UP w Lublinie). Jestem również autorką i współautorką 31 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych. W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych byłam autorką lub współautorką 8 publikacji oraz 7 doniesień zjazdowych. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych opublikowałam 26 publikacji oraz 24 doniesienia zjazdowe.

Łączna sumaryczna punktacja MNiSW - **398 pkt**

Łączny sumaryczny Impact Factor publikacji - **17,080**

Liczba cytowań wg. bazy Web of Science : **65**

Liczba cytowań bez autocytowań wg. bazy Web of Science : **47**

Indeks Hirscha wg. bazy Web of Science - **4**

6. Udział w realizacji projektów badawczych

Od 2007 roku do chwili obecnej nieprzerwanie realizuję badania w ramach projektów grantowych:

1. **Kierownik projektu** „Modyfikacje neoplazji wątrobowej wzbudzonej reprogramowaniem układu monocytarno/makrofagowego u szczurów i ludzi”

Czas realizacji: 02.09.2015 r. – 01.01.2019 r.

Grant NCN DEC-2014/15/B/NZ5/01587

2. **Główny wykonawca** projektu „Ocena przydatności terapeutycznej komórek owalnych w uszkodzeniach wątroby u szczurów”

Czas realizacji: 23.10.2007 r.- 22.10.2010 r.

Grant MNiSzW nr N N308 316933

3. **Wykonawca** projektu: „Prenatalne i postnatalne programowanie tempa dojrzewania płciowego owiec oraz jego wpływ na poziom leptyny i ekspresję układu KiSS-1/GPR54 w przysadce mózgowej”-

Okres realizacji: 30.09.2010 r. – 29.12.2013r.

Nr projektu MNiSzW: N N308 598439

7. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

W 2009 roku byłam stypendystką Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (DAAD) i przebywałam na dwumiesięcznym stażu w Katedrze i Klinice Gastroenterologii i Endokrynologii, Uniwersytetu w Getyndze, (Georg-August University in Göttingen, Germany, Department of Gastroenterology and Endocrinology, Clinic of Internal Medicine, **Germany**). Po zakończeniu stażu w w/w Klinice odbyłam 7-dniowy staż dydaktyczny w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Gospodarskich, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Getyndze, (Institute of Veterinary Medicine, Department of Molecular Biology of Livestock, University of Göttingen, **Germany**). Staż dydaktyczny odbyłam w ramach programu ERASMUS. Ponadto w ciągu swojej kariery naukowej 6-krotnie korzystałam z programu Erasmus, wyjeżdżałam na staże szkoleniowe i dydaktyczne do **Włoch** (Piza), **Niemiec** (Hanower) i na **Węgry** (Budapeszt).

7. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową

Dwukrotnie otrzymałam nagrody JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego: jedną zespołową II stopnia, za osiągnięcia naukowe w latach 2008-2010 oraz nagrodę indywidualną III stopnia, za osiągnięcia naukowe w latach 2011-2013.

8. Uczestnictwo w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Zarówno w okresie przed jak i po uzyskaniu stopnia dr. nauk weterynaryjnych aktywnie uczestniczyłam w wielu międzynarodowych i krajowych konferencjach, gdzie prezentowałam uzyskane w swoich badaniach wyniki:

1. **Wójcik Marta**, Wessely-Szponder Joanna, Bobowiec Ryszard, Kosior-Korzecka Urszula, 2016, "Activity of neoplastic rat hepatocytes co-cultured with proinflammatory macrophages (M-1) in vitro". XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk weterynaryjnych, 22-24 września, Lublin.
2. **Wójcik Marta**, 2013, „Modelowy przykład konstruowania wirtualnego problemu/pacjenta przy wykorzystaniu programu Casus.” Konferencja: Wykorzystanie innowacyjnych metod w procesie kształcenia i oceny studentów na kierunku weterynaria. 12 grudnia, Lublin.
3. **Wójcik Marta**, Giorgi Mario, Bobowiec Ryszard. 2012, Significance of stem cells in hepatocarcinogenesis in rats, XIV, Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 13-15 września, Wrocław.
4. **Wójcik Marta**, 15-16 kwietnia 2011 r., „Komórki macierzyste w nowotworowych uszkodzeniach wątroby”. Lubelska Edycja IV Warsztatów DNA- encyklopedia życia; Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
5. **Wójcik Marta**, 2009; "Liver regeneration: effects of carotenoids on proliferation and differentiation of liver stem cells in vitro.", IVM Tierärztliches Institutsseminar, Tierärztliches Institut, Göttingen; 24 marzec, Göttingen.
6. **Wójcik Marta**, Bobowiec Ryszard, Martelli Franco, 2008, Effect of carotenoids on in vitro proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic liver injuries in rats. 24th Congress of the Polish Physiological Society, September 11-13, Lublin, Poland.
7. **Wójcik Marta**, Bobowiec Ryszard, Borowska Katarzyna, Kowalski Cezary, 2004, Zmiany w wydzielaniu ubichinonu Q10 i witaminy E w żółci w przebiegu stresu oksydacyjnego wątroby u owiec. XII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 15-17. września, Warszawa.

8. Działalność dydaktyczna

Od początku mojej pracy w Zakładzie Patofizjologii do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotu Patofizjologia dla studentów III roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Jestem też współautorką treści programowych realizowanych w ramach tego

przedmiotu. Dla studentów III roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, prowadziłam również zajęcia z przedmiotu „Choroby zwierząt laboratoryjnych” (2003 r. – 2014r.), za który byłam odpowiedzialna (w latach 2010-2015). W 2009 roku napisałam program, a następnie przez kolejne lata realizowałam zajęcia z przedmiotu „Transformacje nowotworowe u zwierząt”. Od roku akademickiego 2018/2019 jestem odpowiedzialna za ten przedmiot.

Od 2013 roku do chwili obecnej, realizując zajęcia dla studentów anglojęzycznych w ramach programu Erasmus, prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „Pathophysiology”, „Neoplastic Transformations” oraz „Diseases of Laboratory Animals”.

Od 2013 r. do 2017 r. prowadziłam zajęcia z przedmiotu „Kliniczny zarys chorób” dla studentów dziennych i zaocznych na kierunku Dietetyka z Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii. Jestem też współautorem treści dydaktycznych realizowanych w ramach tego przedmiotu.

W roku 2013/14 realizowałam zajęcia dla studium doktoranckiego z przedmiotu „Metody badawcze w naukach weterynaryjnych” gdzie prowadziłam zajęcia z przedmiotu „Hodowle komórek zwierzęcych in vitro”.

W roku 2014/15 realizowałam część zajęć „Bioethical Aspects of Research and Didactics” na I roku anglojęzycznych studiów III stopnia na Wydziałach Medycyny Weterynaryjnej oraz na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt UP w Lublinie.

W ramach działalności dydaktycznej byłam wykonawcą międzynarodowego grantu europejskiego „**Use of virtual problems/virtual patients in veterinary basic sciences**”, gdzie współtworzyłam komputerowe programy dydaktyczne dla studentów II roku Wydziałów Medycyny Weterynaryjnej (Lublin, Hanower, Budapeszt) za co w 2015 roku zostałam uhonorowana wraz z pozostałymi wykonawcami grantu **Nagrodą Zespołową Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** za osiągnięcia dydaktyczne.

Ponadto, corocznie od 2004 roku do chwili obecnej sprawuję opiekę nad studentami wykonującymi badania naukowe w ramach **Sekcji Patofizjologii Studenckiego Koła Medyków Weterynaryjnych**. Znaczna część zrealizowanych pod moim kierunkiem prac otrzymywała wysokie nagrody bądź wyróżnienia na krajowych i międzynarodowych Sejmikach Kół Studenckich.

Brałam aktywny udział w wykładach specjalistycznych i warsztatach szkoleniowych dotyczących zastosowania e-learningu dla studentów Medycyny Weterynaryjnej - „Novice Summerschol 2011”.

W ramach popularyzacji nauki oprócz aktywnego uczestnictwa w kilku edycjach Lubelskiego Festiwalu Nauki, brałam udział w Międzynarodowej Konferencji „Elise Project Partners

Meeting in Lubelskie Region” 27-28 marzec 2018, Lublin, Poland., gdzie prezentowałam wykład pt. “Improvement of cancer therapy based on animal models of hepatic tumours.”

10. Działalność organizacyjna

W swojej pracy zawodowej wielokrotnie brałam udział jako sekretarz naukowy lub skarbnik, w organizacji międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych, za którą to działalność otrzymałam Nagrody Indywidualne I i III stopnia JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Od 2003 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. W Lubelskim Oddziale PTF, w latach 2003- 2005 pełniłam funkcję sekretarza, obecnie (od 2005r.) jestem skarbnikiem.

Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej oraz innej działalności (wg. DzU. Nr196, poz 1165) przedstawiłam załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.



Lublin, 11.12.2018. *Małgorzata Wójcik*

