

## AUTOREFERAT

o zainteresowaniach i osiągnięciach w działalności naukowo-badawczej oraz działalności dydaktycznej z elementami życiorysu

### **I. Przebieg pracy zawodowej**

W 1987 roku ukończyłam II Liceum Ogólnokształcące im. E. Plater w Białej Podlaskiej, a następnie rozpoczęłam studia w Akademii Rolniczej w Lublinie. Jestem absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie. Studia ukończyłam w 1993 roku z wynikiem dobrym. Po uzyskaniu dyplomu lekarza weterynarii rozpoczęłam pracę zawodową 1 grudnia 1993 roku w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w charakterze asystenta (obecnie Zakład Fizjologii Zwierząt Katedry Biochemii i Fizjologii Zwierząt). Szybko opanowałam zakres wiedzy oraz metody badawcze z zakresu fizjologii zwierząt i aktywnie włączyłam się do badań naukowych prowadzonych w Katedrze. Stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych uzyskałam po powrocie z urlopu wychowawczego w 2004 roku na podstawie rozprawy pt.: „Wpływ deksametazonu i alfa-ketoglutaranu (AKG) na rozwój i mineralizację układu kostnoszkieletowego u prosiąt w okresie ostatnich tygodni życia prenatalnego i 14 dni życia neonatalnego”, której promotorem był prof. dr hab. Tadeusz Studziński.

Z dniem 1 października 2004 roku zostałam mianowana na stanowisko adiunkta w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Katedry Biochemii i Fizjologii Zwierząt, w którym pracuje do chwili obecnej. Od czasu zatrudnienia moje zainteresowania naukowo-badawcze poszerzyły się o ocenę wpływu różnych czynników na rozwój organizmu w okresie prenatalnym i wczesno neonatalnym, w tym głównie na rozwój układu kostnego i pokarmowego.

Nie pełniłam funkcji ani promotora ani promotora pomocniczego.

## II.

Zgodnie z Ustawą z dnia 18 marca 2011 roku, określającej wymagania dotyczące Art 16 ust.2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku przedstawiam cykl 8 jednotematycznych publikacji z lat 2007-2012 pod wspólnym tytułem: „**Negatywne efekty prenatalnego programowania rozwoju postnatalnego prosiąt przy zastosowaniu deksametazonu**” jako spełniony warunek do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Oświadczam, że we wszystkich publikacjach stanowiących szczególne moje osiągnięcia naukowe byłam autorem koncepcji badań i głównym wykonawcą. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem. Cykl ten obejmuje 2 prace przeglądowe stanowiące wstęp (MNiSW -10) i 6 prac oryginalnych zawierających wyniki badań (MNiSW-165, IF-9,237).

1. Śliwa E., Dobrowolski P.: Perinatal programming of skeletal system. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2007, 1:112-118.
2. Tomaszewska E., Dobrowolski P.: Prenatal glucocorticoids can programme postnatal development. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Researches* 5, 7-11:2011.
3. Śliwa E., Dobrowolski P., Piersiak T.: Bone development of suckling piglets after prenatal, neonatal or perinatal treatment with dexamethasone. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2010, 94: 293-306.
4. Tomaszewska E., Dobrowolski P., Puzio I.: Postnatal administration of 2-oxoglutaric acid improves the intestinal barrier affected by the prenatal action of dexamethasone in pigs. *Nutrition* 2011, 28:190-196.
5. Tomaszewska E., Dobrowolski P.: Maternal glucocorticoid treatment as a model for examining foetal gender-specific effects on the development that influences the bone metabolism of neonatal piglets. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2012, 56:247-253.
6. Tomaszewska E., Dobrowolski P., Siwicki A.K.: Maternal treatment with dexamethasone at minimal therapeutic doses inhibits neonatal bone development in a gender-dependent manner. *Livstock Science* 2012, 146:175-182.
7. Tomaszewska E., Dobrowolski P., Puzio I.: Morphological changes of the cartilage and bone in newborn piglets evoked by experimentally induced glucocorticoid excess during pregnancy *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* in press 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2012.01319.x

8. Tomaszewska E., Dobrowolski P., Wydrych J.: Postnatal administration of 2-oxoglutaric acid improves articular and growth plate cartilages and bone tissue morphology in pigs prenatally treated with dexamethasone. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2012, 63:547-554.

Podczas rozwoju prenatalnego płód ma zdolność adaptacji metabolicznej do warunków, w których rozwija się nawet, jeśli są one odmienne od prawidłowych procesów fizjologicznych. Proces ten nazywa się „programowaniem”. Bezpośrednio przed i po porodzie hormony kory nadnerczy odgrywają bardzo ważną rolę w adaptacji nowo narodzonego organizmu do nowego środowiska. Syntetyczne glikokortykoidy podawane ciężarnym samicom lub wzrost endogennych glikokortykoidów wywołany czynnikami stresogennymi wywołują szereg zmian o podobnym charakterze. Wiedza o mechanizmach trwałego wewnątrzmacicznego programowania fenotypu płodu jest wciąż znikoma. W celu wyjaśnienia tych zależności w ciągu ostatnich lat zaproponowano kilka hipotez, jednak wiele mechanizmów wciąż pozostaje niezidentyfikowanych. Należy podkreślić, że dotychczas nie prowadzono badań w podobnym zakresie i nie uzyskano dotychczas w pełni satysfakcjonujących informacji o procesach wzrostowych w okresie prenatalnym i możliwościach ingerencji w ich przebieg.

Najważniejszym moim osiągnięciem naukowym z ostatnich lat (2007-2012) są badania dotyczące różnych negatywnych efektów sterowania w okresie prenatalnym rozwojem postnatalnym kręgowców z zastosowaniem glikokortykoidu, deksametazonu. Problematykę badań przedstawiłam w 2 pracach przeglądowych (poz. B. 2.1, 2.2), a wyniki tych badań przedstawiłam w 6 pracach oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie indeksowanym w bazie Journal Citation Reports (poz. A. 26, 29, 31, 32, 33, 35). Badania w obrębie tej problematyki uważam za najważniejsze w mojej całej działalności naukowej.

### **Cele Pracy**

- ocena wpływu prenatalnego podawania syntetycznego glikokortykoidu na rozwój postnatalny układu szkieletowego u świni domowej ze szczególnym uwzględnieniem cech morfologicznych, gęstości mineralnej i własności mechanicznych kości oraz wskaźników biochemicznych metabolizmu tkanki kostnej.

- ocena wpływu prenatalnego podawania syntetycznego glikokortykoidu na rozwój chrząstki stawowej i wzrostowej u świni domowej ze szczególnym uwzględnieniem cech morfologicznych obu chrząstek.

- ocena wpływu prenatalnego podawania syntetycznego glikokortykoidu na rozwój postnatalny bariery jelitowej u świni domowej ze szczególnym uwzględnieniem cech morfologicznych dwunastnicy i jelita czczego.

### **Najważniejsze wnioski**

Uzyskane wyniki wykazały, że podawanie deksametazonu w dawkach minimalnych czy maksymalnych terapeutycznych maciorom w ciągu ostatnich 24 czy 45 dni ciąży:

- wpływa negatywnie na procesy wzrostu i zmienia rozwój postnatalny potomstwa uzyskanego od tych macior zależnie od ich płci.
- hamuje rozwój kości u noworodków świni i indukuje utratę tkanki kostnej poprzez zaburzenia funkcji osi somatotropowej oraz uszkodzenie płytki wzrostowej.
- wpływa negatywnie na morfologię chrząstki stawowej u potomstwa obu płci co może przyczynić się do wystąpienia zmian w czasie normalnego funkcjonowania chrząstki.
- zaburza barierę jelitową, funkcję i integralność nabłonka jelita cienkiego będąc jedną z przyczyn opóźnionego rozwoju postnatalnego prosiąt.

### **III. Dorobek naukowo-badawczy**

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje łącznie 95 pozycji, w tym 46 prac naukowo-badawczych, 4 prace przeglądowe, 45 doniesień na krajowe i międzynarodowe Sympozja i Kongresy. Mój dorobek po doktoracie powiększył się znacząco i obejmuje łącznie 80 pozycji, w tym 42 prace naukowo-badawcze, 3 prace przeglądowe, 35 doniesień na Zjazdy i Kongresy krajowe lub międzynarodowe. Łączna liczba punktów za publikacje w czasopiśmie ujętych na liście MNiSW (zgodnie z wykazem z 2012 roku) wynosi 960 (punkty nie dzielone przez autorów), a sumaryczny Impact Factor według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania) dla wszystkich prac wynosi 41,077, w tym dla 8 wybranych prac - MNiSW-175, IF-**9,237**. Aktualna liczba cytowań opublikowanych prac według bazy Web of Science wynosi – 149, indeks *h*-7.

W 28 pracach jestem pierwszym autorem, w 14 - drugim, w 5 - trzecim, w 1 - czwartym i w 2 - piątym autorem.

Część prac naukowo-badawczych realizowałam w zespołach badawczych z uwagi na szeroki zakres tematyki badań i różnorodność metod badawczych. Natomiast pracę na stopień naukowy doktora n. wet. realizowałam indywidualnie.

Pełnię funkcję recenzenta w kilku zagranicznych czasopiśmie m.in. w *Nutrition*, *Journal of Endocrinology* i *Amino Acids*.

Jak wynika z przedstawionego w wykazie dorobku naukowego moje główne zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół następujących zagadnień:

- 1. Zmian rozwojowych układu szkieletowego kręgowców u kurcząt brojlerów.**
- 2. Zaburzeń metabolizmu tkanki kostnej w przebiegu lityryzmu po spożyciu nasion rośliny motylkowej – groszku zwyczajnego (*Lathyrus sativus L.*) z wykorzystaniem świnki morskiej oraz możliwości zastosowania nasion *Lathyrus sativus L.* w żywieniu tuczników.**
- 3. Roli czynników żywieniowych (clenbuterol, fitaza, chrom) w kształtowaniu cech wytrzymałościowych kości kręgowców.**
- 4. Problematyki fizjologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za trawienie i wchłanianie substancji w obrębie przewodu pokarmowego zwierząt monogastycznych oraz wykorzystania preparatów pochodzenia czosnkowego do stymulacji rozwoju ogólnoustrojowego i mechanizmów obronnych organizmu.**
- 5. Występowania zaburzeń metabolizmu tkanki kostnej u kręgowców (świnia i indyk) i zapobiegania ich negatywnym skutkom.**

**6. Roli czynników hormonalnych i żywieniowych w mechanizmach odporności swoistej i nieswoistej u ssaków.**

**7. Problematyki obejmującej zagadnienia związane z wpływem alfa-ketoglutaranu oraz kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego na prenatalne programowanie rozwoju układu szkieletowego ssaków oraz na zapobieganie schorzeń tkanki kostnej w okresie postnatalnym.**

**8. Problematyki związanej z zaburzeniami metabolizmu kostnego u zwierząt (świnia domowa) po przeprowadzonej eksperymentalnie fundektomii i mechanizmów jego łagodzenia, eliminacji i zapobiegania ze szczególnym uwzględnieniem roli czynników żywieniowych.**

**9. Roli czynników hormonalnych i żywieniowych (deksametazon, akryloamid) na rozwój prenatalny i postnatalny przewodu pokarmowego z wykorzystaniem świni domowej i gryzoni.**

**Ad. 1.** Od momentu podjęcia pracy w Katedrze Fizjologii Zwierząt do chwili obecnej moje badania naukowe skupiają się wokół problematyki związanej z rozwojem układu kostnoszkieletowego kręgowców. Dotyczą one głównie wytrzymałości kości kończyn i struktury tkanki kostnej kręgowców. Byłam pierwszą osobą w Katedrze Fizjologii Zwierząt, która podjęła badania w zakresie rozwoju układu kostnego pod kierownictwem Prof. dr hab. Tadeusza Studzińskiego. Z tego zakresu została opublikowana jedna praca oryginalna (poz. C. 2.1) oraz dwa komunikaty (poz. D. 1.1, 1.4).

C. 2.1. **Śliwa E.**, Radzki R.P.: Zmiany wytrzymałości kości kończyn u kurcząt brojlerów w okresie 10 tygodni rozwoju po wykluciu. *Medycyna Weterynaryjna* 1995, 51:287-290.

W pracy oryginalnej (poz. C. 2.1) stwierdzono różnicowanie czynnościowe i metaboliczne poszczególnych kości kończyny miednicznej jako podporowo-nośnej i piersiowej jako lotnej oraz obecność korelacji między cechami fizycznymi tych kości, co zostało potem wykorzystane do badań nad procesami wzrostowymi i mineralizacji układu kostnego. W pracy przeglądowej (poz. C. 1) zebrano i przedstawiono schorzenia układu kostnego kurcząt, świń i źrebiąt.

C. 1. **Śliwa E.**, Radzki R.P., Puzio I.: Osteochondroza i dyschondroplazja piszczelowa u kurcząt, świń i źrebiąt. *Medycyna Weterynaryjna*. 1996, 52:156-159.

Pod kierownictwem Prof. T. Studzińskiego rozpoczęłam badania nad wpływem czynników żywieniowych, hormonalnych, farmakologicznych i toksykologicznych na procesy rozwoju i mineralizacji układu kostnego. W efekcie w jednostce, w której pracowałam, powstał całkiem nowy kierunek badań dotyczących nie tylko zmian rozwojowych układu kostnego kręgowców, ale schorzeń metabolicznych i patologii układu szkieletowego ssaków i ptaków. Na tej podstawie rozpoczęto badania nad określeniem roli różnych czynników żywieniowych i hormonalnych na stan układu szkieletowego zwierząt. Poznanie fizjologicznych zmian rozwojowych przebiegających w obrębie szkieletu osiowego i obwodowego pozwoliło na podjęcie badań w kierunku możliwości zapobiegania osteopenii u ludzi z wykorzystaniem modelu zwierząt domowych i określenia wpływu różnych czynników hormonalnych na rozwój układu kostnego u kręgowców.

Po raz pierwszy też urządzenie do badań wytrzymałości materiałów na rozciąganie, ściskanie, zginanie, rozrywanie zostało zaadoptowane i wykorzystane do określenia właściwości mechanicznych materiału biologicznego jakim są kości. Przeprowadzając ww. testy określano dwa rodzaje sił działających na kość w przebiegu złamania. Pozwoliło to na ocenę właściwości biomechanicznych kości kurcząt brojlerów w okresie życia powykluciwego (poz. C. 2.1, D. 1.1, 1.2, 1.3, 1.4).

**Ad. 2.** W kolejnym okresie mojej działalności naukowej do chwili obecnej jednym z zasadniczych kierunków badań jest charakterystyka cech układu kostnego, ich zmienności w zależności od wieku oraz sposobu żywienia. Praca naukowo-badawcza o charakterze metodycznym i aplikacyjnym (poz. B. 1.1, 1.2) oraz dwie inne prace (poz. D. 1.5, 1.6) zawierają oryginalne dane dotyczące wpływu żywienia nasionami groszku zwyczajnego, rośliny zielnej z rodziny motylkowatych, występującej w strefie umiarkowanej półkuli północnej oraz w Afryce i Ameryce Południowej.

B. 1.1. Sadurska A., Studziński T., **Śliwa E.**, Grela E.: Effect of dietary supplementation with grass pea (*Lathyrus sativus* L.) and evening primrose seeds (*Oenothera biennis* L.) on biomechanical parameters of the limb bone in guinea pigs. *Annales UMCS, Sectio EE*. 1998, 16:321-327.

B. 1.2. Grela E., **Śliwa E.**, Puzio I., Radzki R. P., Studziński T.: Wpływ nasion lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w żywieniu tuczników na parametry fizyczne kości udowej, ramiennej, łokciowej i promieniowej. *Annales UMCS, Sectio DD*. 1997, 52:17-27.

D. 1.5. **Śliwa E.**, Grela E., Sadurska A., Kafkowska E.: Wpływ surowych i ekstradowanych nasion lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w diecie dla świnek morskich na cechy biomechaniczne kości kończyn. Wydawnictwo AR w Lublinie.

D. 1.6. Grela E., **Śliwa E.**, Sadurska A., Winiarska A.: Wpływ surowych i ekstradowanych nasion lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w mieszankach dla tuczników na cechy biomechaniczne kości kończyn. Wydawnictwo AR w Lublinie.

W krajach borykających się z niedożywieniem groszek ze względu na swoje niewielkie wymagania i możliwość przeprowadzenia kilku zbiorów w ciągu roku, jest podstawowym źródłem białka. Nasiona zawierają jednak alkaloid, który wywołuje zatrucia zwane latyryzmem. Są to zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego pojawiające się po spożyciu na surowo, ugotowanych lub w postaci mąki, nasion różnych gatunków groszku. Choroba ma charakter przewlekły i notowana jest częściej w krajach o ciepłym klimacie, podczas gdy w klimacie umiarkowanym jest bardzo rzadko spotykana. Zaprezentowane w tych pracach wyniki dotyczą charakterystyki właściwości mechanicznych układu kostnego oraz ich zmienności uwarunkowanej gatunkiem zwierząt i sposobem obróbki technologicznej paszy zawierającej nasiona *Lathyrus sativus* L. zwanego soczewicą podlaską. Badania nad wpływem surowych i ekstradowanych nasion lędzwanu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w diecie zwierząt na cechy biomechaniczne kości kończyn były przeprowadzone na dwóch gatunkach: śwince morskiej i świni domowej w okresie tuczu. Podjęte badania były wykonane w ramach projektu badawczego 5 P06E 062 08, realizowanego w Instytucie Żywienia Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie i stanowiły podstawę do dalszych badań nad wykorzystaniem nasion groszku jako dodatku paszowego dla zwierząt oraz przedstawienia prawdopodobnych zmian wytrzymałości kości w przebiegu latyryzmu u ludzi. Szereg wyników z tego zakresu prezentowałam w formie ustnej na Międzynarodowym Sympozjum Naukowym Lędzwan siewny - agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi w Radomiu, 9-10 czerwca 1997 roku.

**Ad.3.** Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowo-badawczych realizowanych zespołowo, który można uznać za wiodący, są zagadnienia dotyczące możliwości wykorzystania różnych czynników żywieniowych w zapobieganiu utracie tkanki kostnej u zwierząt.

Jako czynnik został zastosowany beta-2-sympatykomimetyk i antykatabolik. Clenbuterol jest lekiem powszechnie stosowanym na całym świecie w astmie oskrzelowej.



Sympatykomimetyki stosuje się również w leczeniu nadciśnienia, arytmii, migreny oraz szoku anafilatycznego. Badania przeprowadzane na zwierzętach wykazały skutki anaboliczne stosowania clenbuterolu, dlatego stosowany też jest jako antykatabolik. Przeprowadzone w tym zakresie badania wykazały, że układ adrenergiczny pełni istotną rolę w metabolizmie tkanki kostnej. Wyrazem tej aktywności był wzrost wytrzymałości mechanicznej, gęstości mineralnej kości kurcząt brojlerów (poz. D. 1.2).

Kolejno podjęte przeze mnie badania zespołowe obejmowały problematykę związaną z obszarem wpływu dostępności pierwiastków w paszy zwierząt na stan funkcjonalny ich układu kostnego. W badaniach tych została wykorzystana fitaza. W przewodzie pokarmowym fosfor z paszy uwalniany jest dzięki enzymom fosfatazie alkalicznej lub fitazie. Prawie wszystkie pasze roślinne zawierają fitazę różniącą się aktywnością. Najwyższą aktywnością fitazy charakteryzuje się żyto, pszenica i otręby pszenne, najniższą zaś owies, kukurydza i groch. Zwierzęta monogastryczne nie mając flory bakteryjnej nie mogą trawić włókna pokarmowego, fitynianów, tanin i substancji antyodżywczych. Dlatego zaczęto do paszy dodawać enzymy, aby w ten sposób zwiększyć strawność i wykorzystanie niektórych składników. W badaniach na modelu szczura ujęto również wpływ bioaktywnego chromu na właściwości mechaniczne kości (poz. C. 2.2). W 1996 roku opracowałam grantowy projekt promotorski pt.: „Wpływ dodatku Cr organicznego w diecie świń na procesy mineralizacji, wzrostu i rozwoju tkanki kostnej w okresie pierwszych czterech miesięcy życia i w okresie tuczu końcowego do masy 130 kg”, którego kierownikiem był Prof. dr hab. Tadeusz Studziński. Fundusze jednak nie zostały przyznane.

C. 2.2. Grela E., Śliwa E., Radzki R.P., Puzio I.: Wpływ fitazy i chromu w mieszankach z lędźwianem na cechy kości szczurów. *Medycyna Weterynaryjna* 1997, 53:273-276.

**Ad.4.** W okresie poprzedzającym uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych moje zainteresowania naukowo-badawcze skupiały się głównie wokół problematyki wpływu substancji bioaktywnych w czosnku na rozwój ogólnoustrojowy prosiąt, ze szczególnym uwzględnieniem cech funkcjonalnych i strukturalnych przewodu pokarmowego. Badania te były realizowane w ramach projektu zamawianego PB Nr PBZ-KBN-093/P06/2003 pt. „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego”, którego byłam jednym z głównych wykonawców. Projekt był realizowany we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Żywności,

Oddziału Nauk o Żywności Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN; z Katedrą Fizjologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego; z Katedrą Nauk Fizjologicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Zadania badawcze realizowano w okresie od listopada 2003 roku do listopada 2006 roku. Głównym impulsem do podjęcia badań był narastający problem infekcji bakteryjnych w okresie około odsadzeniowym prosiąt (między 28 a 35 dniem życia) oraz proces wycofania probiotyków z pasz. Celem badań było określenie wpływu wodno-alkoholowego wyciągu czosnku – AGE (Aged Garlic Extract) i allicyny podawanych w okresie prenatalnym i postnatalnie na procesy wzrostowo-rozwojowe i immunologiczne zachodzące w organizmie prosiąt w okresie odsadzenia. Pierwszy etap badań polegał na podawaniu substancji biologicznie czynnych zawartych w wodno-alkoholowym wyciągu czosnku (AGE) oraz allicyny ciężarnym i laktującym maciorom, jako czynników potencjalnie stymulujących wcześniejsze dojrzewanie przewodu pokarmowego u ich potomstwa w okresie neonatalnym i postnatalnym. Badane substancje podawano *per os* maciorom od 91-go dnia ciąży przez cały okres karmienia prosiąt do momentu odsadzenia tych prosiąt w 28 dniu ich życia. Podczas gdy AGE (10 ml/100 kg m.c./dzień) i allicyna (1,6 mg/kg m.c./dzień) podawane były maciorom z grup doświadczalnych, olej sojowy jako vehiculum podawano maciorom należącym do grupy kontrolnej. Noworodki z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych oraz prosięta w wieku 1, 3, 7, 14, 28, 35 i 56 dni życia ważono oraz pobierano próbki krwi i tkanek do badań w celu określenia wpływu badanych substancji na kinetykę dojrzewania przewodu pokarmowego oraz podstawowe parametry odporności nieswoistej i swoistej. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano pozytywny wpływ podawania ciężarnym i karmiącym maciorom wodno-alkoholowego wyciągu czosnku i allicyny na tempo wzrostu i masy ciała prosiąt. Zaobserwowano także, że podawanie ciężarnym i karmiącym maciorom AGE i allicyny zwiększa masę narządów wewnętrznych i długość jelita cienkiego u prosiąt. Przeprowadzone badania histologiczne z użyciem techniki mikroskopii konfokalnej wykazały, że allicyna i AGE wpływają korzystnie na parametry morfologiczne błony śluzowej jelita cienkiego (dwunastnica, jelito czcze 25%, 50% i 75% długości oraz jelito kręte) takie jak długość i szerokość kosmków, pole powierzchni przekroju kosmków, liczba kosmków, głębokość krypt jelitowych i grubość błony śluzowej. Badanie zawartości białka ogólnego, poziomu immunoglobulin, aktywności ceruloplazminy i lizozymu w osoczu krwi prosiąt i macior wykazało wzrost tych parametrów w wyniku prenatalnego i postnatalnego podawania AGE i allicyny.

W okresie tym odbyłam dwukrotne szkolenie w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej k. Warszawy. Podczas stażu zapoznałam się z obsługą „sztucznej maciory”, urządzenia pozwalającego na utrzymanie noworodków w warunkach żywienia mieszankami mlekozastępczymi. Odbyte szkolenia pozwoliły mi na podjęcie wraz z zespołem drugiego etapu zadań badawczych w ramach projektu zamawianego, które obejmowały doświadczenie na prosiętach przebywających przez 6 dni w sztucznej maciorze, począwszy od 3 doby życia. Podczas doświadczenia, wagowo dobrane prosięta były podzielone na grupę kontrolną oraz 3 grupy doświadczalne. Prosięta z pierwszej i drugiej grupy doświadczalnej otrzymywały *per os* AGE w dwóch różnych dawkach (1ml/kg m.c. i 2ml/kg m.c./dzień), podczas gdy allicynę podawano *per os* prosiętom należącym do trzeciej grupy doświadczalnej w dawce 1 mg/kg m.c./dzień. Wszystkie prosięta utrzymywane w sztucznej maciorze karmiono preparatem mlekozastępczym 6 razy na dobę, w równych odstępach czasu. W wieku 2 i 8 dni życia pobrano od prosiąt próbki krwi do badań parametrów odporności nieswoistej i swoistej. W wieku 8 dni życia prosięta zostały poddane eutanazji i pobrano od nich próbki tkanek przewodu pokarmowego do badań, celem określenia wpływu badanych substancji na kinetykę dojrzewania przewodu pokarmowego.

Korzystne efekty suplementacji AGE i allicyny *per os* uzyskano u prosiąt przebywających w warunkach sztucznej maciory. Zaobserwowano, że prosięta otrzymujące AGE i allicynę uzyskały wyższe wartości masy ciała, parametrów morfologicznych jelita cienkiego oraz parametrów odporności nieswoistej takich jak aktywność lizozymu i ceruloplazminy w surowicy krwi. Uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań wskazują na pozytywne oddziaływanie substancji biologicznie czynnych zawartych w czosnku na rozwój ogólnoustrojowy, parametry funkcjonalne i strukturalne przewodu pokarmowego oraz mechanizmy odporności nieswoistej i swoistej organizmu. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania AGE i allicyny jako suplementów diety, stanowiąc alternatywę dla antybiotyków paszowych w celu optymalnego przygotowania prosiąt do odsadzenia, poprawy funkcji przewodu pokarmowego oraz stymulacji szybszego tempa wzrostu prosiąt. Zgodnie z założeniami projektu, wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, iż istnieje możliwość modulowania funkcji mechanizmów odporności swoistej i nieswoistej oraz sterowania rozwojem przewodu pokarmowego prosiąt i ich wcześniejsze przygotowanie do odsadzenia poprzez podaż substancji biologicznie aktywnych zarówno ciężarnym i karmiącym maciorom jak i prosiętom w okresie życia neonatalnego. Jako

wykonawca projektu uczestniczyłam czynnie w 12<sup>th</sup> Congress of Polish Society of Clinical and Experimental Immunology, który miał miejsce w Lublinie, prezentując wyniki badań prowadzonych w ramach realizowanego projektu (poz. D. 1.7, 1.8, 1.13). Z tego zakresu powstały również prace badawczo-naukowe (poz. A. 5, 7, 11, 12, 14, 24).

A. 5. Dudek K., Tatar M.R., **Śliwa E.**, Siwicki A., Łuszczewska-Sierakowska I., Zipser J., Studziński T.: Effects of perinatal administration of aged garlic extract (AGE) and allicin on non-specific and specific defence mechanisms in sows. Polish Journal of Environmental Studies 2005, 14(Suppl. II):69-72.

A. 7. Tatar M.R., **Śliwa E.**, Dudek K., Siwicki A. K., Kowalik S., Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Zipser J., Studziński T.: Influence of perinatal administration of aged garlic extract (AGE) and allicin to sows on some defence mechanisms in their piglets during postnatal life. Polish Journal of Environmental Studies 2005, 14(Suppl. II):378-381.

A. 11. Tatar M.R., **Śliwa E.**, Dudek K., Mosiewicz J., Studziński T.: Effect of aged garlic extract and allicin administration to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets. Part I. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:349-355.

A. 12. Tatar M.R., **Śliwa E.**, Dudek K., Kowalik S., Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Studziński T.: Effect of aged garlic extract and allicin administration to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets: Morphological properties of the small intestine. Part II. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:455-464.

A. 14. Dudek K., **Śliwa E.**, Tatar M.R.: Changes in blood leukocyte pattern in piglets from sows treated with garlic preparations Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2006, 50:263-267.

A. 24. Tatar M.R., **Śliwa E.**, Dudek K., Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Mosiewicz J., Siwicki A.K., Studziński T.: Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. Annals of Agricultural and Environmental Medicine (Ann Agric Environ Med) 2008, 15:63-69.

**Ad.5.** Kontynuacją tematyki z zakresu rozwoju układu kostnego u zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem okresu prenatalnego jest praca doktorska i kolejnych kilka prac oryginalnych powstałych z tego zakresu uzyskanych w ramach ministerialnego projektu badawczego PB Nr 2 P06K/00828 „Wpływ alfa-ketoglutaranu i deksametazonu na wzrost i rozwój układu kostnoszkieletowego prosiąt w okresie prenatalnym i neonatalnym”, którego byłam głównym wykonawcą.

Badania obejmowały okres płodowy, w którym układ kostnoszkieletowy wraz z towarzyszącą tkanką łączną i mięśniową podlega intensywnym zmianom szczególnie w ostatnich tygodniach ciąży. Badania wykazały, że nawet najmniejsza ingerencja farmakologiczna upośledza prawidłowe uformowanie układu kostnego i następową funkcjonalną sprawność w okresie neonatalnego i postnatalnego rozwoju organizmu. Po raz pierwszy podjęłam też badania, których celem było określenie wpływ dodatku substancji biologicznie czynnych w diecie ciężarnych samic na rozwój i wzrost oraz właściwości mechaniczne kości u ich potomstwa. W badaniach tych użyłam syntetycznego glikokortykoidu, deksametazonu powszechnie i szeroko

stosowanego w terapii leczniczej zarówno u ludzi jak i zwierząt. Deksametazon pozbawiony jest działania mineralokortykosteroidowego i diabetogennego. W wyniku stosowania glikokortykoidów często dochodzi jednak do osteoporozy polekowej.

Wykazałam, że prosięta, które w okresie 3 ostatnich tygodni rozwoju prenatalnego znajdowały się pod wpływem deksametazonu (3mg/48h/cieżarną maciore), charakteryzowały się makrosomią i zwiększoną masą badanych kości (ramiennej, udowej i żeber) w momencie narodzin. W dalszej części eksperymentu podawałam deksametazon (w dawce 0,5 mg/kg/m.c./48 h; w okresie pierwszych 14 dni życia) prosiętom, które pochodziły od macior otrzymujących w ciąży deksametazon. W ten sposób zahamowałam ogólny wzrost prosiąt, wzrost i dojrzewanie kości, ujawniające się zmniejszeniem parametrów geometrycznych, mechanicznych, gęstości i zawartości mineralnej kości, parametrów histologicznych beleczek kostnych. Wyniki tych badań łączą oryginalne wartości poznawcze z realną perspektywą ich aplikacyjności w zakresie funkcjonalnego i strukturalnego modelowania rozwoju układu kostnoszkieletowego w okresie prenatalnym i neonatalnym w uwarunkowaniu od mechanizmów hormonalnych (deksametazon – glikokortykosteroidy). Z tego zakresu powstały trzy prace przeglądowe (poz. B. 2.1, 2.2, C.3), grupa prac badawczo-naukowych (poz. A. 1, 3, 16, C. 4.2, 4.3, 4.4) oraz komunikaty (poz. D. 2.8, 2.28).

A. 1. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tatar M.R., Studziński T.: Effect of maternal administration of dexamethasone during last weeks of pregnancy on foetal skeletal system in pigs. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2004, 48:449-452.

A. 3. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tatar M.R., Majcher P., Krupski W., Studziński T.: Effects of dexamethasone on physical properties and mineral density of long bones in piglets. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:97-100.

A. 16. **Śliwa E.**, Tatar M.R., Nowakowski H., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weeks of prenatal life in pigs. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2006, 19:489-493.

B. 2.1. **Śliwa E.**, Dobrowolski P.: Perinatal programming of skeletal system. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research 2007, 1:112-118.

B. 2.2. **Tomaszewska E.**, Dobrowolski P.: Prenatal glucocorticoids can programme postnatal development. Journal of Pre-Clinical and Clinical Researches 2011, 5:7-11.

C. 3. **Śliwa E.**, Studziński T., Tatar M. R.: Glikokortykosteroidy a metabolizm i wzrost kości. Medycyna Weterynaryjna 2006, 62:377-379.

C. 4.2 **Śliwa E.**, Wawrzyniak-Gacek A., Tatar M. R., Kowalik S., Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ deksametazonu i alfa-ketoglutaranu na wzrost i rozwój układu kostnego u świń (Influence of dexamethasone and alpha-ketoglutarate on growth and development of the skeletal system of pigs). Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:526-531.

C. 4.3. **Śliwa E.**, Tatar M. R., Kowalik S., Krupski W., Majcher P., Piersiak T., Studziński T.: Wpływ deksametazonu na wzrost i mineralizację układu kostnego w okresie prenatalnym u świń. Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:1145-1148.

C. 4.4. **Śliwa E.**, Tatar M. R., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ podawania deksametazonu i alfa-ketoglutaranu ciężarnym maciorom na poziom wybranych hormonów we krwi noworodków. *Medycyna Weterynaryjna* 2005, 61:1405-1407.

Badania ostatnich lat wykazały też, że stany stresowe, niedożywienie, a także słabo zbilansowana dieta prowadzą do ujemnego bilansu azotu w organizmie z równoczesnym zahamowaniem wzrostu, podczas gdy glutamina i jej pochodne metabolity takie jak  $\alpha$ -ketoglutaran (AKG) i ornityno-alfaketoglutaran (OKG) mogą przeciwdziałać tym efektom. Zapotrzebowanie na glutaminę wzrasta szczególnie w stanach intensywnego wzrostu somatycznego w okresie pourodzeniowym (szczególnie w okresie odsadzenia), połączonego z działaniem stresu termicznego, jak również w niedożywieniu i niedojrzałości neonatalnej oraz stanach upośledzonej czynności trawiennej (poz. B. 3.3).

B. 3.3. Dobrowolski P., **Śliwa E.**: The weaning-related changes in amino acids status of blood plasma in piglets. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2008, 2:71-74.

Ponieważ glutamina charakteryzuje się małą stabilnością w roztworach jako źródło i substytut glutaminy zastosowałam alfa-ketoglutaran (AKG, 2-Ox). Badania nad wpływem AKG były częścią współpracy z Katedrą Biologii Komórki i Organizmów Uniwersytetu w Lund w Szwecji, czego wynikiem są wspólne publikacje (poz. A. 10, 13, 16, 17, 22, 25, 30, 34, poz C. 4.2, 4.4) oraz komunikaty (poz. D. 1.11, D. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.15, 2.20).

A. 10. Kowalik S., Filip R. S., **Śliwa E.**, Tatar M.R., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Influence of alpha-ketoglutarate on bone mineral density of the femur in piglets. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2005, 49:343-348.

A. 13. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tatar M.R., Krupski W., Majcher P., Łuszczewska-Sierakowska I., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) given to pregnant sows on development of humerus and femur in newborns. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2005, 49:117-120.

A. 16. **Śliwa E.**, Tatar M.R., Nowakowski H., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weeks of prenatal life in pigs. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2006, 19:489-493.

A. 17. **Śliwa E.**, Tatar M.R., Pierzynowski S.G.: Total cholesterol, glucose and electrolytes in piglets` serum after alpha-ketoglutarate (AKG) and dexamethasone treatment during prenatal and neonatal life. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2006, 50:561-566.

A. 22. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Siwicki A.K., Pierzynowski S.G.: Changes of non-specific defence mechanism in blood serum of piglets induced by prenatal and postnatal administration of alpha-ketoglutarate. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2007, 51: 297-301.

A. 25. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Tatar M.R., Piersiak T., Siwicki A., Rokita E, Pierzynowski S.G.: Alpha-ketoglutarate protects the liver of piglets exposed during prenatal life to chronic excess of dexamethasone from metabolic and structural changes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2009, 93:192-202.

A. 30. Dobrowolski P., Huet P., Karlsson P., Eriksson S., **Tomaszewska E.**, Gawron A., Pierzynowski S.G.: Potato fibre protects the small intestine wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition* 2012, 28:428-435.

- A. 34. Dobrowolski P., **Tomaszewska E.**, Radzki R.P., Bienko M., Wydrych J., Zdybel A., Pierzynowski S.G., Can 2-oxoglutarate prevent changes in bone evoked by omeprazole? Nutrition in press 2012.
- C. 4.2 **Śliwa E.**, Wawrzyniak-Gacek A., Tataro M. R., Kowalik S., Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ dexametazonu i alfa-ketoglutaranu na wzrost i rozwój układu kostnego u świń Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:526-531.
- C. 4.4. **Śliwa E.**, Tataro M. R., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ podawania deksametazonu i alfa-ketoglutaranu ciężarnym maciom na poziom wybranych hormonów we krwi noworodków. Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:1405-1407.

W zakresie badań przeprowadzonych na indyku, które miały na celu określenie wpływu podawania drogą przewodu pokarmowego soli ornitynowej alfa-ketoglutaranu (OKG) na własności geometryczne, mechaniczne i gęstość mineralną kości, wraz z zespołem poszukiwałam nowych i skutecznych sposobów zapobiegania schorzeniom tkanki kostnej. Wynikiem tych badań było odkrycie, że ornityno alfa-ketoglutaran zwiększa istotnie gęstość mineralną i wytrzymałość mechaniczną kości indyków, natomiast jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za te efekty jest zwiększona synteza aminokwasów, zwłaszcza proliny, która stanowi prekursor hydroksyproliny, będącej głównym składnikiem kolagenu tkanki kostnej. Po raz pierwszy wykazano w tych badaniach, że aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach – BCAAs (branched-chain amino acids) takie jak leucyna, izoleucyna i walina pełnią istotną rolę w regulacji metabolizmu tkanki kostnej. Owocem tych badań są prace oryginalne (poz. A. 9, 15; poz. C. 4.1).

- A. 9. Tataro M.R., Brodzki A., Krupski W., **Śliwa E.**, Silmanowicz P., Majcher P., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) on bone homeostasis and plasma amino acids in turkeys. Poultry Science 2005, 84:1604-1609.
- A. 15. Tataro M.R., **Śliwa E.**, Krupski W., Brodzki A., Pasternak K.: Ornithine alpha-ketoglutarate increases mineralization and mechanical properties of tibia in turkeys. Bone 2006, 39:100-105.
- A. 4.1. Tataro M. R., Sierant-Roźmiej N., Krupski W., Majcher P., **Śliwa E.**, Kowalik S., Studziński T.: Zastosowanie ilościowej tomografii komputerowej w ocenie mineralizacji kości udowej i piszczelowej indyka. Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:225-228.

W swoich badaniach natomiast wykazałam, że alfa-ketoglutaran (AKG, 2-Ox) podawany ciężarnym maciom w okresie ostatnich 24 dni ciąży wpływał korzystnie na przygotowanie strukturalne i czynnościowe układu kostnoszkieletowego płodu do funkcji podporowo-nośnych w okresie życia neonatalnego głównie poprzez korzystne zmiany geometrii związane z szybszym dojrzewaniem kości mimo negatywnego wpływu na ich mineralizację. W okresie neonatalnym AKG również wpływał korzystnie na procesy mineralizacji, co w połączeniu z lepiej przygotowaną geometrią kości z okresu prenatalnego zwiększało ich wytrzymałość na działanie

sił odkształcających zapewniając lepsze funkcje lokomotoryczne. Podawanie AKG *per os* w okresie neonatalnym powoduje przyspieszone dojrzewanie układu kostno-szkieletowego przez wzrost wartości własności mechanicznych i wyższe parametry geometryczne kości (poz. A. 2, 13, 16). Uzyskane wyniki były prezentowane na sympozjach w Naantali w Finlandii oraz w Pradze (poz. D. 2.7, 2.8, 2.10).

A. 2. Kowalik S., **Śliwa E.**, Tataro M.R., Krupski W., Majcher P., Studziński T.: Influence of alpha-ketoglutarate (AKG) on mineral density, geometrical and mechanical parameters of femora during postnatal life in piglets. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:107-111.

A. 13. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tataro M.R., Krupski W., Majcher P., Łuszczewska-Sierakowska I., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) given to pregnant sows on development of humerus and femur in newborns. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:117-120.

A. 16. **Śliwa E.**, Tataro M.R., Nowakowski H., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weeks of prenatal life in pigs. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2006, 19:489-493.

W swoich badaniach wykazałam również po raz pierwszy, że AKG podawany ciężarnym maciorom eliminuje niekorzystny wpływ deksametazonu na prenatalny rozwój układu szkieletowego prosiąt (poz. A. 16, poz. C. 4.2 oraz poz. D. 2.8, 2.10).

A. 16. **Śliwa E.**, Tataro M.R., Nowakowski H., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weeks of prenatal life in pigs. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2006, 19:489-493.

C. 4.2 **Śliwa E.**, Wawrzyniak-Gacek A., Tataro M. R., Kowalik S., Łuszczewska-Sierakowska I., Krupski W., Majcher P., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ deksametazonu i alfa-ketoglutaranu na wzrost i rozwój układu kostnego u świń Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:526-531.

W badaniach własnych na prosiątach będących pod wpływem deksametazonu i AKG w okresie życia prenatalnego i neonatalnego również po raz pierwszy wykazałam, że podawanie AKG obniża poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi. W pracy określony został wpływ deksametazonu i AKG na poziom całkowitego cholesterolu, glukozy, jonów Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> oraz wapnia całkowitego w surowicy krwi noworodków i prosiąt w okresie neonatalnym. Próbkę krwi pobierałam od niessących nowo narodzonych prosiąt urodzonych przez maciory, którym podawano AKG (0.4 g/kg m.c., codziennie *per os*) od 91 dnia ciąży do momentu porodu łącznie lub oddzielnie z deksametazonem (3 mg/maciorę, i.m. 48h). Drugi raz próbki krwi pobierałam od prosiąt w wieku 14 dni życia neonatalnego, w czasie których kontynuowano podawanie AKG i/lub deksametazonu w zależności od przynależności do grupy. Poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi nowo narodzonych prosiąt był najwyższy w grupie kontrolnej i wynosił 40,6



mg%, podczas gdy najniższy był w grupie AKG (27,9 mg%). Poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi prosiąt w wieku 14 dni w grupach AKG+Dex i Dex wynosił 304 mg% i 273 mg%, odpowiednio, a w grupie AKG tylko 155 mg%, zaś w kontroli 197 mg%. Obniżony poziom całkowitego cholesterolu w surowicy krwi prosiąt nowo narodzonych i w wieku 14 dni po prenatalnym i neonatalnym wpływie AKG wskazuje na ten sam efekt. AKG podawany macirom w czasie ostatnich tygodni ciąży obniżał poziom  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  w surowicy krwi prosiąt, ale nie wpływał na ich poziomy po dalszych 14 dniach podawania w okresie neonatalnym. Wyniki przedstawiające wpływ AKG na poziom cholesterolu całkowitego są unikalne i bardzo wartościowe ze względu na fakt bardzo dużego podobieństwa profilu lipidowego surowicy krwi u prosiąt i ludzi (poz. A. 17). Moje wstępne badania pozwoliły na szersze podjęcie tego kierunku badań w Zakładzie. W tym zakresie powstały kolejne moje prace oryginalne, w których analizą objęłam noworodki i ich matki ( poz. A. 25, poz. B. 3.1).

A. 25. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Tataro M.R., Piersiak T., Siwicki A., Rokita E, Pierzynowski S.G.: Alpha-ketoglutarate protects the liver of piglets exposed during prenatal life to chronic excess of dexamethasone from metabolic and structural changes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2009, 93:192-202.

B. 3.1. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Tataro M. R., Pierzynowski S. G.: Alpha-ketoglutarate partially protects newborns from metabolic changes evoked by chronic maternal exposure to glucocorticoids. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2007, 1:55-59.

Zainteresowaniem swoim objęłam również stan hormonalny organizmu nowo narodzonego będącego pod wpływem deksametazonu i AKG w okresie prenatalnym i neonatalnym. W badaniach tych stwierdzono, że poziom hormonu wzrostu w surowicy krwi prosiąt uległ istotnemu podwyższeniu pod wpływem łącznego stosowania deksametazonu i AKG u maciorek w czasie ciąży w porównaniu z kontrolą i grupami, w których maciory otrzymywały tylko deksametazon lub tylko AKG. Poziom insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF-I) w surowicy krwi prosiąt wzrósł pod wpływem podawania AKG ciężarnym macirom. Prenatalne stosowanie deksametazonu powodowało podwyższenie poziomu insuliny w porównaniu z grupą będącą pod wpływem AKG. Podawanie deksametazonu w okresie prenatalnym powodowało podwyższenie poziomu kortyzolu w surowicy krwi u nowo narodzonych prosiąt w porównaniu z grupą kontrolną. Istotnie wyższe stężenie kortyzolu odnotowano także w grupie będącej pod wpływem AKG w okresie prenatalnym. Najwyższy poziom osteokalcyny stwierdzono w grupie kontrolnej noworodków niessących, nieco niższy w grupie noworodków będącej pod wpływem łącznie podawanych AKG i deksametazonu w okresie płodowym, najniższe poziomy

stwierdzono w grupie noworodków urodzonych przez maciory traktowane deksametazonem w czasie ostatnich tygodni ciąży. Stosowany deksametazon w ciąży u macior przyczyniał się do ponad trzykrotnego zmniejszenia stężenia osteokalcyny u prosiąt w odniesieniu do grupy kontrolnej, zwiększał prawie dwukrotnie stężenie kortyzolu, pozostając bez wpływu na stężenie hormonu wzrostu w surowicy krwi w tym okresie (poz. A. 16, poz. C. 4.4).

C. 4.4. **Śliwa E.**, Tataro M. R., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Wpływ podawania deksametazonu i alfa-ketoglutaranu ciężarnym maciorom na poziom wybranych hormonów we krwi noworodków. *Medycyna Weterynaryjna* 2005, 61:1405-1407.

W badaniach swoich ujęłam również prosięta w wieku 14 dni, u których najwyższy poziom osteokalcyny stwierdziłam w grupie, w której kontynuowano w okresie neonatalnym z okresu płodowego podawanie AKG i deksametazonu, a najniższy w grupie, w której kontynuowano podawanie samego deksametazonu. Podawanie deksametazonu prosiętom przez pierwszych 14 dni ich życia neonatalnego, urodzonym przez matki otrzymujące również deksametazon w ciąży przez 3 tygodnie skutkowało zmniejszeniem siedmiokrotnym stężenia kortyzolu w surowicy krwi prosiąt w porównaniu z grupą kontrolną tego wieku. W porównaniu z okresem okołourodzeniowym stwierdzono ponad dziesięciokrotny wzrost stężenia osteokalcyny i dwukrotny wzrost stężenia IGF-I. AKG podawany łącznie z deksametazonem prosiętom, urodzonym przez maciory otrzymujące w ciąży AKG razem z deksametazonem, zwiększał stężenie osteokalcyny, hormonu wzrostu, zmniejszał jednak stężenie kortyzolu i insuliny w porównaniu z grupą kontrolną. W odniesieniu do okresu okołourodzeniowego stwierdzono trzykrotny wzrost stężenia osteokalcyny, ponad dwukrotny wzrost stężenia IGF-I i ośmiokrotny spadek stężenia kortyzolu we krwi prosiąt 14-dniowych.

Kontynuacją uprzednio podjętych badań nad wpływem AKG i deksametazonu na poziom wybranych czynników hormonalnych jest również praca oryginalna o wpływie łącznego i oddzielnego podawania deksametazonu i AKG na poziom hormonu wzrostu, kortyzolu i insulinopodobnego czynnika wzrostu-I u prosiąt (poz. A. 18).

A. 18. **Śliwa E.**: Effect of simultaneous versus apart administration of dexamethasone and alpha-ketoglutarate on growth hormone, cortisol and insulin-like growth factor-I in piglets. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2006, 50:205-210.

Celem tego doświadczenia było określenie wpływu deksametazonu i AKG podawanych łącznie lub oddzielnie podczas obu okresów prenatalnego i postnatalnego na poziom kortyzolu, hormonu wzrostu i insulinopodobnego czynnika wzrostu-I w surowicy krwi u prosiąt 30-dniowych. Procedura eksperymentalna była prowadzona od 91 dnia ciąży do porodu. Maciorom *per os* podawano AKG w dawce 0.4 g/kg m.c./dzień (grupa AKG), oraz deksametazon w iniekcji (*i. m.*) w dawce 3 mg/maciorę/48 h (grupa Dex), i grupa AKG+Dex, w której deksametazon i AKG podawano podobnie jak w poprzednich grupach. Noworodki były dzielone zgodnie z podziałem macior w celu kontynuacji podawania deksametazonu i AKG. Pierwszej grupie prosiąt *per os* podawano AKG w dawce 0.4 g/kg m.c./dzień (grupa AKG), drugiej grupie deksametazon domięśniowo (grupa Dex) w dawce 0.5 mg/ kg m.c./48 h. Trzecia grupa otrzymywała deksametazon łącznie z AKG podobnie jak w pozostałych grupach prosiąt (grupa Dex+AKG). Eksperyment na prosiątach trwał do 30 dnia życia postnatalnego. Prosięta będące pod wpływem deksametazonu podczas 24 ostatnich dni ciąży u macior i 30 dni życia po urodzeniu miały końcową masę ciała niższą o 38% w porównaniu z prosiętami traktowanymi AKG i o 35% w porównaniu z grupą Dex+AKG. Ponadto, poziom hormonu wzrostu, IGF-I i kortyzolu był najniższy w grupie Dex. Tutaj była istotna korelacja między masą ciała a poziomem w surowicy IGF-I ( $r = -0.92$ ). Stężenie hormonu wzrostu i IGF-I były najwyższe w grupie AKG. Poziom GH i IGF-I był istotnie skorelowany w grupie AKG ( $r = 0.7$ ) i Dex+AKG ( $r = 0.64$ ). Ponadto, masa ciała i IGF-I były pozytywnie i istotnie skorelowane w grupie AKG ( $r = 0.67$ ). Łączne podawanie AKG i deksametazonu poprawia przyrosty masy ciała i podnosi poziom kortyzolu w surowicy krwi prosiąt w porównaniu ze zwierzętami traktowanymi wyłącznie deksametazonem, który istotnie obniżał poziom kortyzolu w surowicy krwi.

Do chwili obecnej interesuję się negatywnym działaniem glikokortykoidów. Pierwsza moja praca przeglądowa na ten temat ukazała się w 2006 roku (poz. C. 3).

C. 3. **Śliwa E.**, Studziński T., Tatar M. R.: Glikokortykosteroidy a metabolizm i wzrost kości. *Medycyna Weterynaryjna* 2006, 62:377-379.

Podawane w okresie prenatalnym syntetyczne glikokortykoidy wykazują farmakologiczne działanie wieloukładowe, które w warunkach długotrwałego stosowania doprowadzać mogą do tzw. wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR - Intra Uterine Growth Retardation). Z IUGR ściśle powiązany jest fenomen określany w języku angielskim jako catch up, czyli

zjawisko przyspieszenia wzrostowo-rozwojowego w celu zrównania z wiekową grupą rówieśniczą. Wyniki moich badań dowodzą, że płód poddany działaniu egzogennych glikokortykoidów w czasie intensywnego wzrostu przypadającego na ostatnie tygodnie okresu prenatalnego, w okresie okołoporodowym charakteryzuje się niedojrzałym geometrycznie układem kostnym (zmniejszona jama szpikowa) i osłabioną mineralizacją. W konsekwencji parametry mechaniczne kości (siła krańcowa i maksymalna siła elastyczna) również ulegają redukcji. Kość staje się słabsza, pomimo wspomnianego działania anabolicznego na jej masę. Masa kości ramiennej była zbliżona do masy kości udowej przeciwnie niż to wynika z analizy parametrycznej kości noworodków uzyskanych z ciąży fizjologicznych. Kość ramienna nowo narodzonych zwierząt fizjologicznie jest masywniejsza i bardziej dojrzała pod względem budowy geometrycznej kości w porównaniu z kością udową, natomiast w okresie postnatalnym masywniejsza i mocniejsza staje się kość udowa (poz. A. 1, 13, 16, poz. C. 4.3).

A. 1. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tatar M.R., Studziński T.: Effect of maternal administration of dexamethasone during last weeks of pregnancy on foetal skeletal system in pigs. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2004, 48:449-452.

A. 13. **Śliwa E.**, Kowalik S., Tatar M.R., Krupski W., Majcher P., Łuszczewska-Sierakowska I., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) given to pregnant sows on development of humerus and femur in newborns. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2005, 49:117-120.

A. 16. **Śliwa E.**, Tatar M.R., Nowakowski H., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weeks of prenatal life in pigs. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2006, 19:489-493.

C. 4.3. **Śliwa E.**, Tatar M. R., Kowalik S., Krupski W., Majcher P., Piersiak T., Studziński T.: Wpływ deksametazonu na wzrost i mineralizację układu kostnego w okresie prenatalnym u świń. Medycyna Weterynaryjna 2005, 61:1145-1148.

Wynika to prawdopodobnie z wyłączenia funkcji podporowych i napędowych kończyn biodrowych oraz swobodniejszych ruchów kończyn piersiowych prosiąt w okresie płodowym. Moje najnowsze badania wykazały również, że catch up jako wzrost kompensacyjny u prosiąt poddanych działaniu deksametazonu w łącznej dawce 36 mg w czasie ostatnich 24 dni życia prenatalnego, może wystąpić już około 30 dni po narodzinach. Kompensacja ta jednak dotyczy masy ciała, parametrów geometrycznych, masy i długości głównie kości długich. Rozwój i mineralizacja kości klatki piersiowej nie podlegają kompensacji. Silna redukcja parametrów mechanicznych żeber potwierdza brak całkowitego osiągnięcia catch up w mineralizacji kości (poz. A. 26 oraz poz. D. 2.9, 2.19).

A. 26. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Piersiak T.: Bone development of suckling piglets after prenatal, neonatal or perinatal treatment with dexamethasone. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2010, 94:293-306.

Zmiany spowodowane zaburzeniem procesów metabolicznych w okresie prenatalnym w intensywnie rozwijającym się układzie kostnym mają negatywne następstwa, które zależą od tego jak długo ciężarna samica była poddana działaniu glikokortykoidów. Podawanie deksametazonu ciężarnym świnom w ostatnich 45 dniach ciąży w identycznych dawkach, jakie zastosowano uprzednio w ostatnich 24 dniach ciąży, wywołało negatywny efekt postnatalny o dużo bardziej trwałym charakterze. Zwierzęta otrzymane od macior traktowanych deksametazonem w ostatnich 45 dniach ciąży, charakteryzowały się znacznie zredukowaną masą ciała i mineralizacją kości długich w wieku 9 miesięcy życia (poz. D. 1.14). Z innych badań wynika również, że wpływ glikokortykoidów w okresie prenatalnym zależy od płci. Deksametazon stosowany w dawce 3 mg na ciężarną maciorę co 48 godzin wykazał nasilone działanie hamujące rozwój układu kostnego u knurków badanych w wieku 35 dni życia (poz. D. 1.15, 2.15, 2.18, 2.23, 2.26, 2.27).

W roku 2005 mój temat badawczy obejmował również wpływ postnatalnego podawania AKG na rozwój układu kostnego u świni w warunkach uszkadzającego działania deksametazonu w okresie prenatalnym dłuższym niż ostatnie 24 dni ciąży. Celem było określenie wpływu AKG podawanego *per os* w okresie postnatalnym prosiętom urodzonym przez maciory otrzymujące glikokortykoidy w czasie ciąży na wzrost i rozwój ich układu kostnego. Maciory zostały podzielone na grupę kontrolną otrzymującą płyn fizjologiczny oraz grupę macior otrzymujących deksametazon w ilości 3mg/sztukę/48h od 70 dnia ciąży do momentu porodu (około 116 dnia ciąży). Prosięta w chwili porodu zostały zważone i podzielone na 3 grupy (w grupach dodatkowo na loszki i knurki): Grupa I - kontrola - z ciąży kontrolnej, która otrzymywała postnatalnie płyn fizjologiczny *per os*; Grupa II - d/k - urodzone przez maciory otrzymujące deksametazon w ciąży, prosięta otrzymywały płyn fizjologiczny do 35 dnia życia postnatalnego; Grupa III - d/a - urodzone przez maciory otrzymujące deksametazon w ciąży, prosięta natomiast otrzymywały AKG *per os* w dawce 0,4 g /kg m.c./dzień. W 35 dniu życia wyizolowano kości ramienne, udowe i żebra od pary 5 do 8. W 35 dniu jest widocznie zahamowany wzrost knurków w grupie d/k w porównaniu z knurkami kontrolnymi oraz statystycznie istotny wzrost średniej masy ciała knurków i loszek w grupie d/a w porównaniu z pozostałymi grupami. Knurki z grupy d/k charakteryzowały się krótszymi piszczelami. AKG wykazał efekt ochronny przed niszczącym działaniem deksametazonu względem nie tylko kości, ale chrząstki stawowej i wzrostowej (poz.

A. 35).

A. 35. **Tomaszewska E.**, Dobrowolski P., Wydrych J.: Postnatal administration of 2-oxoglutaric acid improves articular and growth plate cartilages and bone tissue morphology in pigs prenatally treated with dexamethasone. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2012, 63:547-554.

**Ad. 6.** Innym obiektem moich zainteresowań naukowych są zagadnienia z zakresu immunologii zwierząt. Ponieważ deksametazon hamuje fosfodiesterazę, w rezultacie wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, a to hamuje aktywację limfocytów; hamuje immunostymulację przez uniemożliwienie proliferacji limfocytów w odpowiedzi na antygen; hamuje powstawanie komórek pamięci, obniża wtórną reakcję na antygen; hamuje syntezę cytokin. A w 4 godziny po podaniu występuje przejściowa limfopenia – przemieszczenie limfocytów do tkanek; wzrost liczby białych krwinek obojętnochłonnych przez uruchomienie puli marginalnej i zmniejszenie ich migracji do tkanek; spadek liczby monocytów i bazofili; zmniejszenie liczby eozynofili. We współpracy z Prof. dr hab. A Siwickim z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie określiłam aktywność lizozymu i ceruloplazminy. Współpraca ta umożliwiła stwierdzenie, że deksametazon w zastosowanych dawkach (3mg/kg m.c./ 48 h/sztukę) u macior od 91 dnia ciąży powoduje obniżenie aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz poziomu białka ogólnego u niessących noworodków; deksametazon zastosowany dalej w okresie 14 dni życia neonatalnego w dawce 0,5 mg/kg/m.c./48 h powoduje wzrost aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz wzrost poziomu białka ogólnego w 72 godzinie oraz wzrost aktywności lizozymu i spadek aktywności ceruloplazminy 14 dnia życia neonatalnego.

Badania wykazały również, że deksametazon podany łącznie z AKG ciężarnym maciorom w ostatnich tygodniach ciąży powoduje obniżenie aktywności lizozymu i wzrost aktywności ceruloplazminy oraz poziomu immunoglobulin u noworodków niessących; deksametazon podany dalej w okresie 14 dni życia neonatalnego łącznie z AKG powoduje wzrost aktywności lizozymu w 72 godzinie i 14 dnia życia neonatalnego oraz spadek aktywności ceruloplazminy 14 dnia życia neonatalnego prosiąt.

Podawanie zaś samego AKG ciężarnym maciorom w ostatnich tygodniach ciąży powoduje spadek liczby leukocytów i aktywności lizozymu u noworodków niessących, a kontynuacja podawania AKG prosiętom w okresie neonatalnym powoduje wzrost aktywności

lizozymu, spadek aktywności ceruloplazminy oraz zmniejszenie liczby leukocytów i poziomu gammaglobulin szczególnie w 72 godzinie życia neonatalnego.

W oparciu o te wyniki powstały 3 prace oryginalne i doniesienia, które prezentowałam w formie ustnej na 12<sup>th</sup> Congress of Polish Society of Clinical and Experimental Immunology, który miał miejsce w Lublinie w 2005 roku (poz. A. 4, 6, 8, poz. D. 1.9, 1.10, 1.11).

A. 4. **Śliwa E.**, Tataro M.R., Dudek K., Siwicki A. K., Kowalik S., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Influence of alpha-ketoglutarate administered to pregnant sows on nonspecific and specific humoral defence mechanism in newborn piglets and during two weeks of neonatal life. Polish Journal of Environmental Studies 2005, 14(Suppl. II):356-359.

A. 6. **Śliwa E.**, Tataro M.R., Siwicki A. K., Studziński T.: Lysozyme and ceruloplasmin activity in blood plasma of piglets under the prenatal and neonatal influence of dexamethasone. Polish Journal of Environmental Studies 2005, 14(Suppl. II):360-362.

A. 8. **Śliwa E.**, Tataro M.R., Siwicki A. K., Badzian B., Krupski W., Łuszczewska-Sierakowska I., Pierzynowski S. G., Studziński T.: Synergic effect of dexamethasone and alpha-ketoglutarate on the humoral defense mechanism in pigs. Polish Journal of Environmental Studies 2005, 14(Suppl. II):363-366.

Kontynuacją badań w tym zakresie jest praca pt.: "Changes of non-specific defence mechanism in blood serum of piglets induced by prenatal and postnatal administration of alpha-ketoglutarate" opublikowana w Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy w 2007 roku (poz. A. 22) oraz praca z Livestock Science z 2012 roku (poz. A. 32).

A. 32. **Tomaszewska E.**, Dobrowolski P., Siwicki A.K.: Maternal treatment with dexamethasone at minimal therapeutic doses inhibits neonatal bone development in a gender-dependent manner. Livestock Science 2012, 146:175-182.

**Ad.7.** W ostatnich latach zaangażowałam się w realizację kilku projektów badawczych, w tym ministerialnego projektu badawczego PB Nr 2 P06Z 012 29 „Wpływ efektów prenatalnego działania alfa-ketoglutaranu i kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego na programowanie rozwoju układu kostnego świń”, którego byłam jednym z głównych wykonawców. Projekt był realizowany zespołowo w latach 2005-2008. Podjęto w nim problematykę prenatalnego programowania rozwoju postnatalnego narządów, układów i całego organizmu. Na słuszność koncepcji takiego podejścia doświadczalnego polegającego na prenatalnej ingerencji wskazywały wyniki dotychczasowych badań z wykorzystaniem deksametazonu i AKG. Nowy projekt umożliwił zbadanie wpływu oddzielnego i łącznego podawania ciężarnym maciorom AKG i kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego na prenatalny metabolizm wzrostowo-rozwojowy tkanki kostnej u płodów, co może mieć konsekwencje w trakcie ich rozwoju postnatalnego i na

osiągnięcie szczytowej masy kostnej (PBM – Peak Bone Mass) u osobników dorosłych. Stwierdzenie pozytywnego oddziaływania tych związków podawanych ciężarnym maciorom na wytrzymałość mechaniczną i mineralizację kości płodów, badanych również postnatalnie, a także u osobników z całkowicie rozwiniętym kośćcem, może ułatwić opracowanie skutecznego sposobu zapobiegania schorzeniom układu kostnego zwierząt, występujących powszechnie u osobników rosnących i dorosłych, zarówno u zwierząt jak i ludzi. Badań nad prenatalnym programowaniem rozwoju układu kostnego z zastosowaniem kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego wcześniej nie przeprowadzono zarówno u zwierząt jak i ludzi.

Do realizacji celu badawczego wykorzystano naturalne substancje metaboliczne, biologicznie czynne, podawane ciężarnym maciorom drogą przewodu pokarmowego, a fizjologicznie występujące u żywych kręgowców i biorące udział w przemianach cyklu Krebsa oraz syntezie aminokwasów i białek pełniących istotne funkcje w rozwoju i utrzymaniu homeostazy układu kostnego oraz całego organizmu zwierząt wyższych i człowieka. AKG i 3-hydroksy-3-metylomasłan, jako metabolity żywieniowe zmniejszają degradację białek, przez co wywierają wpływ na układ kostnoszkieletowy oraz procesy jego dojrzewania i mineralizacji. Ten korzystny efekt anaboliczny, wywierany przez te dwa metabolity został udokumentowany we własnych badaniach pilotażowych i w warunkach pełnego potwierdzenia doświadczalnego może przynosić niewątpliwe korzyści produkcyjne w okresie odchowu i tuczu trzody chlewnej. Podawanie tych dwu naturalnych metabolitów glutaminy i leucyny, aktywnych biologicznie, ciężarnej maciorze w ostatniej fazie ciąży, przyspiesza rozwój i dojrzałość prosiąt w okresie postnatalnym (poz. A. 20).

A. 20. Tataro R.M., Śliwa E., Krupski W.: Prenatal programming of skeletal development in the offspring: Effects of maternal treatment with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone* 2007, 40:1615-1622.

Poznanie wpływu AKG i 3-hydroksy-3-metylomasłanu na procesy wzrostu, dojrzewania i mineralizacji układu kostnoszkieletowego u płodów świni stworzyło możliwości prowadzenia nowych koncepcyjnie i metodycznie badań w dziedzinie położnictwa i neonatologii na gatunku i modelu biologicznie podobnym i najbliższym człowiekowi. Należy także podkreślić, że ze względu na szereg podobieństw anatomiczno-fizjologicznych układu pokarmowego oraz procesów trawienia i wchłaniania substancji pokarmowych, makroelementów i mikroelementów u świni domowej i człowieka, zaproponowano w projekcie wykorzystanie tego gatunku jako



gatunku modelowego do badań nad metabolizmem tkanki kostnej w warunkach rozwoju prenatalnego organizmu.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji ww. projektu były prezentowane na konferencjach międzynarodowych (poz. D. 2.5, 2.6, 2.7, 2.11, 2.12, 2.16, 2.21).

Praca nad wpływem kwasu 3-hydroksy-3-metylomastłowego na metabolizm tkanki kostnej obejmuje również badania przeprowadzone zespołowo na indyku jako drobiu użytkowym (poz. D. 1.12, D. 2.18, 2.19, 2.20).

**Ad.8.** W latach 2005-2008 byłem kierownikiem i głównym wykonawcą ministerialnego projektu badawczego PB Nr 2 P06K 036 29 „Wpływ podawania alfa-ketoglutaranu i kwasu 3-hydroksy-3-metylomastłowego na metabolizm tkanki kostnej u świń poddanych fundektomii”.

Badania zostały podjęte z uwagi na fakt, że osteoporoza stała się współcześnie najbardziej powszechną chorobą metaboliczną tkanki kostnej u ludzi. Największy problem stanowią złamania kości udowej. Złamania te są przyczyną dużej śmiertelności pacjentów, natomiast ich leczenie wymaga największych nakładów finansowych. Natomiast konsekwencją eliminacji fizjologicznych funkcji żołądka w wyniku przeprowadzenia gastrektomii całkowitej lub częściowej (np. fundektomii; Fx) jest upośledzenie procesów trawienia i wchłaniania oraz endokrynnych mechanizmów utrzymujących homeostazę układową organizmu. Związane z tym zaburzenia metabolizmu prowadzą do występowania znacznych zmian funkcjonalnych całego organizmu, a w tym także układu kostnego.

Przeprowadzone badania wskazują, że AKG i 3-hydroksy-3-metylomaslan (HMB) podawane zarówno łącznie jak i oddzielnie prosiętom poddanym fundektomii zmniejszają następowe negatywne efekty osteopeniczne wywołane chirurgicznym usunięciem dna żołądka. Pozytywny wpływ AKG i HMB na mineralizację kośćca prosiąt w warunkach rozwijającej się osteopenii został udokumentowany przez uzyskanie istotnie wyższych wartości vBMD oraz gęstości hydroksyapatytu wapnia istoty beleczkowej i korowej, BMD oraz BMC badanych kości u prosiąt z grup AKG, HMB i AKG+HMB w porównaniu z grupą Fx. Korzystny wpływ AKG i HMB na własności strukturalne kości został wykazany przez korzystne oddziaływanie tych substancji na długość, masę oraz parametry geometryczne takie jak pole przekroju poprzecznego, wtórny moment bezwładności, średnia względna grubość ściany oraz wskaźnik korowo-trzonowy kości. Efektem wpływu AKG i HMB na gęstość mineralną kości oraz własności geometryczne

był wzrost wartości parametrów mechanicznych kości tj. maksymalna siła sprężysta i siła krańcowa. Wyniki badań dokumentujące istotne zmiany koncentracji takich hormonów jak grelina, hormon wzrostu, IGF-1, insulina, leptyna i adiponektyna w surowicy krwi prosiąt poddanych fundektomii w porównaniu z grupą zwierząt rzekomo operowanych wskazują na udział tych czynników w patomechanizmach odpowiedzialnych za rozwój zmian osteopenicznych. Badania aktywności i koncentracji markerów metabolizmu kostnego tj. kostna frakcja fosfatazy zasadowej i C-końcowy telopeptyd kolagenu typu-I w surowicy krwi prosiąt objętych doświadczeniem wskazują na anaboliczne oddziaływanie AKG i HMB podawanych zarówno oddzielnie jak i łącznie na metabolizm tkanki kostnej. Potencjalnymi czynnikami odpowiedzialnymi za indukcję efektów anabolicznych przez AKG i HMB na tkankę kostną mogą być hormony takie jak GH, IGF-1, leptyna i adiponektyna. Uzyskane wyniki wskazują, że rozwój osteopenii związany jest ze zmianami w puli wolnych aminokwasów we krwi, natomiast anaboliczne oddziaływanie łącznego i oddzielnego podawania AKG i HMB na tkankę kostną może być wynikiem korzystnego wpływu tych naturalnych biologicznie aktywnych substancji na absorpcję i metabolizm aminokwasów. Przeprowadzone badania wskazują na różną koncentrację wolnych aminokwasów w osoczu krwi w zależności od czasu jaki upłynął od podania zwierzętom badanych substancji. Bardziej wyraziste efekty łącznego i oddzielnego podawania AKG i HMB prosiętom poddanym fundektomii w odniesieniu do koncentracji wolnych aminokwasów we krwi zaobserwowano 2 godziny od podania badanych substancji w porównaniu z tymi wskaźnikami oznaczanymi we krwi 24 godziny od tego czasu. Rozwój osteopenii szkieletu związany był ze zmniejszoną koncentracją leucyny, izoleucyny, waliny, glicyny, metioniny, tauryny, treoniny, cytruliny, tyrozyny, fenyloalaniny, tryptofanu, ornityny, lizyny, histydyny i argininy w osoczu krwi prosiąt 8-miesięcznych w porównaniu z grupą rzekomo operowaną. Zaobserwowany wzrost koncentracji glutaminianu, proliny, cystyny i lizyny w osoczu krwi świń z grupy Fx po 24-godzinnej głodówce w porównaniu ze zwierzętami rzekomo operowanymi sugerują, że może to być pochodną nasilonych procesów katabolicznych w organizmie w następstwie fundektomii, czego wyrazem jest także drastycznie zmniejszona końcowa masa prosiąt w tej grupie. AKG wyzwolił istotny wzrost koncentracji waliny, metioniny, treoniny, izoleucyny, tyrozyny, tryptofanu i argininy w porównaniu ze zwierzętami należącymi do grupy fundektomizowanej i otrzymującej placebo. Podawanie HMB zwierzętom z fundektomią wywołało wzrost koncentracji treoniny, argininy, leucyny, waliny, metioniny,

asparaginianu, alaniny, cytruliny, tyrozyny, tryptofanu, ornityny i lizyny w osoczu w porównaniu z grupą Fx. Łączne podawanie AKG i HMB prosiętom poddanym fundektomii wyzwoliło wzrost stężenia treoniny, seryny, cystyny, tyrozyny, leucyny, izoleucyny, waliny, glicyny, metioniny, alaniny, kwasu cysteinowego, tauryny, asparaginianu, cytruliny, fenyloalaniny, tryptofanu, ornityny, histydyny i argininy w osoczu krwi prosiąt w porównaniu ze zwierzętami grupy Fx otrzymującymi placebo. Anaboliczne oddziaływanie AKG i HMB na koncentrację wolnych aminokwasów we krwi było związane nie tylko z korzystnym efektem tych metabolitów na własności kości udowych i piszczelowych, ale również ze zwiększoną końcową masą ciała prosiąt w grupach AKG, HMB i AKG+HMB w porównaniu ze zwierzętami grupy Fx, co wskazuje inhibicyjny wpływ podawania tych substancji na procesy kataboliczne w organizmie. Uzyskane wyniki nie wykazały addytywnego efektu podawania AKG i HMB, prosiętom po fundektomii, na gęstość mineralną, własności geometryczne i mechaniczne kości udowej i piszczelowej. Efekty addytywne oddziaływania AKG i HMB stwierdzono w odniesieniu do koncentracji takich aminokwasów jak glicyna, walina, tyrozyna, seryna, fenyloalanina, kwas cysteinowy i histydyna. Podawanie AKG i HMB prosiętom nie wyzwoliło także całkowitej eliminacji negatywnych zmian w obrębie szkieletu po przeprowadzonej fundektomii. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno AKG jak i HMB mogą zostać perspektywnie wykorzystane w nowych podejściach profilaktyczno-terapeutycznych skierowanych na przeciwdziałanie rozwojowi osteopenii i osteoporozy u ludzi. Należy podkreślić, że fundektomia była jedynie zastosowanym eksperymentalnie modelem metodycznym do indukcji silnie negatywnych zmian metabolicznych tkanki kostnej i własności szkieletu, co pozwala przypuszczać, że AKG i HMB mogą być wykorzystywane również do zapobiegania osteopenii/osteoporozie wywoływanej także innymi czynnikami niż tylko częściowa lub całkowita gastrektomia.

Uzyskane wyniki były prezentowane na 3 sympozjach międzynarodowych, organizowanych przez European Calcified Tissue Society (Praga 2006r., Kopenhaga 2007r., Barcelona 2008r.), opublikowano 6 komunikatów zjazdowych i 6 prac naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (poz. A. 19, 21, 23, 27, 28, poz. B. 3.2, poz. D. 2.13, 2.14, 2.17, 2.22, 2.24, 2.25).

A. 19. Maciejewski R., Tataro M.R., **Śliwa E.**, Torres K., Dąbrowski A., Patel J., Solecki M., Łuszczewska-Sierakowska I., Adaszek Ł.: Preliminary study on biological and physical properties of new surgical threads for soft tissues. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2007, 51:167-171.

- A. 21. Tatar M.R., Krupski W., Śliwa E., Maciejewski R., Dąbrowski A.: Fundectomy-evoked osteopenia in pigs is mediated by the gastric-hypothalamic-pituitary axis. *Experimental Biology and Medicine* 2007, 232:1449-1457.
- A. 23. Tatar M.R., Śliwa E., Krupski W., Worzakowska M.: 3-Hydroxy-3-methylbutyrate administration diminishes fundectomy-induced osteopenia of the lumbar spine in pigs. *Nutrition* 2008, 24:753-760.
- A. 27. Śliwa E., Adaszek Ł., Tatar M.R., Dobrowolski P.: Short- and long-term consequences on biochemical markers followed fundectomy in pigs supplemented with 3-hydroxy-3-methylbutyrate and alpha-ketoglutarate. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2010, 123:397-405.
- A. 28. Śliwa E.: 2-Oxoglutaric acid administration diminishes fundectomy-induced osteopenia in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2010, 94:e86-e95.

**Ad.9.** Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowo-badawczych są zagadnienia dotyczące roli hormonalnych i żywieniowych czynników na rozwój prenatalny i postnatalny przewodu pokarmowego. Pierwotnie badania były realizowane w ramach DS -5, którego tematem był wpływ antyżywnościowych składników diety na nerwowe i hormonalne mechanizmy regulacji sekrecji enzymów trzustkowych u zwierząt. W 2003 roku odbyłam tygodniowe szkolenie naukowe w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej k. Warszawy, podczas którego opanowałam metodę izolacji wysepek trzustkowych i metodę oznaczania amylazy w pęcherzykach trzustki wg. Barnfelda.

W roku 2007 zadanie obejmowało określenie wpływu postnatalnego podawania AKG na strukturę wątroby u świń w warunkach uszkodzającego działania deksametazonu, ponieważ czynniki środowiskowe, poza genetycznymi uwarunkowaniami, odgrywają decydującą rolę podczas okresu prenatalnego w odniesieniu do procesów łączących ogólny rozwój płodu z metaboliczno-endokrynnymi następstwami w późniejszym życiu neonatalnym i postnatalnym. Celem badań było określenie wpływu deksametazonu podawanego ciężarnym maciom (3mg/sztukę/48h od 70 dnia ciąży do momentu porodu) na wybrane parametry histomorfometryczne wątrób prosiąt urodzonych przez te maciory oraz zbadanie wpływu podawania AKG tym prosiątom (*per os*; w dawce 0,4 g /kg m.c./codziennie) w okresie neonatalnym. Od prosiąt w wieku 35 dni zostały pobrane wycinki tkanki wątrobowej w celu przeprowadzenia analizy histomorfometrycznej, obejmującej: wielkość jąder komórkowych, powierzchnię jąder komórkowych, wymiar fraktalny przestrzeni międzykomórkowej i wielkość przestrzeni międzykomórkowej. Największą liczbę jąder komórkowych stwierdzono w grupie d/a w porównaniu z grupą kontrolną i grupą d/k. Średnia wielkość jądra komórkowego również była największa w tej grupie i różniła się istotnie statystycznie od średniej wielkości stwierdzonej w grupie kontrolnej i grupie d/k. Średnia wielkość jądra komórkowego w grupie d/k była również istotnie większa w porównaniu z wartością uzyskaną w grupie kontrolnej prosiąt. Całkowita

powierzchnia jąder istotnie uległa zwiększeniu w grupie d/a prosiąt w porównaniu z grupą kontrolną i grupą d/k prosiąt. Wielkość przestrzeni komórkowej wzrosła istotnie w oby grupach kontrolnych w porównaniu z grupą kontrolną, jednak najwyższą wartość stwierdzono w grupie d/k. Wymiar fraktalny przestrzeni komórkowej, świadczący o stopniu jej skomplikowania, stwierdzony w grupie d/k był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną oraz grupą d/a prosiąt. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że AKG podawany prosiątom w czasie 35 dnia życia postnatalnego po uprzednim prenatalnym wpływie chronicznych dawek deksametazonu w czasie życia prenatalnego od 70 dnia ciąży wykazał działanie ochronne względem wątroby w warunkach uszkadzającego działania deksametazonu. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w formie 1 pracy oryginalnej i 1 komunikatu (poz. A. 25, poz. D. 1.16).

A. 25. **Śliwa E.**, Dobrowolski P., Tatar M.R., Piersiak T., Siwicki A., Rokita E, Pierzynowski S.G.: Alpha-ketoglutarate protects the liver of piglets exposed during prenatal life to chronic excess of dexamethasone from metabolic and structural changes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2009, 93:192-202.

W ostatnich latach we współpracy z UMCS podjęłam badania nad wpływem akryloamidu na rozwój prenatalny i postnatalny układu pokarmowego i kości. Akryloamid został zaklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję do Badań nad Nowotworami (IARC) jako prawdopodobny ludzki kancerogen. Jest to również substancja neurotoksyczna i genotoksyczna. Jak wykazały liczne badania akryloamid jest bardzo szeroko rozpowszechniony w wielu produktach spożywczych. Podstawowym źródłem akryloamidu w gotowanym pożywieniu jest asparagina. Aminokwas ten wraz ze składnikiem (węglowodanem) zawierającym aktywną grupę karbonylową tworzy akryloamid w procesie podgrzewania. Inne opracowania łączyły syntezę akryloamidu z reakcją brązowienia (reakcją Maillarda) zachodzącą pod wpływem ciepła między aminokwasami a redukującymi cukrami. Istnieje silna dodatnia korelacja między poziomem cukrów redukujących a powstawaniem akryloamidu.

Akryloamid wywołuje zmiany w błonie śluzowej jelita cienkiego szczurów przez zmniejszenie wymiaru fraktalnego ściany jelita jak i jej składowych takich jak macierz kosmków jelitowych, kształt przestrzeni mleczowych czy nabłonka. Zmiany w świetle jelita powodują natomiast zmniejszenie powierzchni wchłaniania. W działaniu akryloamidu na jelito cienkie zwraca uwagę silny jego wpływ na gruczoły jelitowe. Akryloamid zmniejsza głębokość gruczołów i redukuje ich liczbę. Ocena nabłonka jelitowego wykazuje zmiany w morfologii komórek pokrywających jelito. Akryloamid zwiększa liczbę enterocytów oraz ich wysokość.

Akryloamid zaburza także regenerację nabłonka jelita cienkiego. Obniżona liczba podziałów komórkowych w gruczołach jelitowych czy podwyższona liczba komórek apoptotycznych są ewidentnym tego dowodem. Akrylamid wywiera niekorzystny wpływ na jelitowe sploty nerwowe, przejawiający się osłabieniem reakcji immunohistochemicznej (mniejsza ilość neurofilamentów) oraz zwiększeniem i zaokrągleniem przekrojów poprzecznych jelitowych splotów nerwowych. Obserwacje te sugerują uszkodzenie nerwów i pojawienie się obrzęków (poz. A. 30).

A. 30. Dobrowolski P., Huet P., Karlsson P., Eriksson S., **Tomaszewska E.**, Gawron A., Pierzynowski S.G.: Potato fibre protects the small intestine wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition* 2012, 28:428-435.

Badania własne zostały przeprowadzone na świnkach morskich, których celem było zbadanie wpływu akryloamidu na prenatalne procesy rozwojowe jak i określenie prawdopodobieństwa wystąpienia określonych szkodliwych skutków zdrowotnych w organizmie nowonarodzonym w wyniku narażenia na ekspozycję samicy ciężarnej świnki morskiej na badane czynniki w dawkach uznawanych za nieszkodliwe. Ciężarne świnki morskie otrzymywały akryloamid w wodzie do picia, w dawce 3 mg / kg masy ciała / dobę w ciągu ostatnich 35 dni ciąży (około 65-68 dni), podczas gdy kontrolne świnki morskie otrzymywały tylko wodę. Badania wykazały, że akryloamid może mieć wpływ na rozwój kości w okresie prenatalnym i może zmniejszać proces mineralizacji kości u świnki morskiej (poz. D 2. 29).

#### **IV. Udział w konferencjach**

Uczestniczyłam łącznie w 9 konferencjach i sympozjach, 4 krajowych o charakterze międzynarodowym i 5 zagranicznych; osobiście głosiłam 6 prac w formie prezentacji na 3 konferencjach, 22 prace prezentowałam czynnie w formie plakatów na 7 sympozjach.

#### **V. Szkolenia**

- 20 - 25 maj 2003r. - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej k. Warszawy - naukowe
- 04 - 09 czerwiec 2003r. - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej k. Warszawy - naukowe

- 22 - 24 październik 2002r. - Instytut Medycyny Wsi w Lublinie - naukowe
- 7-11 czerwiec 2010r. - Hiszpania, Cordoba, University of Cordoba - staż dydaktyczny na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, LLP – ERASMUS PROGRAM, Individual Teaching Programme, Staff Mobility for Teaching, Assignments (STA), Academic year 2009/2010

## **VI. Współpraca z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi**

Od wielu lat współpracuję z dwoma ośrodkami krajowymi tj.: Uniwersytetem Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie oraz z Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie oraz jednym ośrodkiem zagranicznym - Uniwersytetem z Lund w Szwecji.

## **VII. Nagrody**

Brażowy medal nadawany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej za długoletnią służbę w szkolnictwie - 2010 rok.

## **VIII. Członkostwo w organizacjach i towarzystwach naukowych**

Od 1993 roku należę do Polskiego Towarzystwa Fizjologów.

## **IX. Projekty**

1. 5 P06E/062 08/1995-1997 pt. Skład chemiczny i użyteczność paszowa nasion lędźwianu siewnego w żywieniu świń (podwykonawca).
2. PBZ-KBN-093/P06/2003-2006 pt. Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowia (wykonawca).
3. 2 P06K/008 28/2004-2007 pt. Wpływ alfa-ketoglutaranu (AKG) i deksametazonu na wzrost i rozwój układu kostnoszkieletowego prosiąt w okresie prenatalnym i neonatalnym (główny wykonawca).
4. 2 P06K 036 29/2005-2008 pt. Wpływ podawania alfa-ketoglutaranu i kwasu-3 hydroksy-3-metylomasłowego na metabolizm tkanki kostnej u świń poddanych fundektomii (kierownik).

5. 2 P06Z 012 29/2005-2008 pt. Wpływ efektów prenatalnego działania alfa-ketoglutaranu oraz kwasu 3-hydroksy-3-metylomastłowego na programowanie rozwoju układu szkieletowego świń (główny wykonawca).
6. Nutricia Research Foundation, USA (2009) Umowa o realizację projektu NR NRG z dnia 15.10.2009. projekt pt. The effect of kynurenic acid enriched diet on the growth and gastrointestinal tract maturation (podwykonawca).

## **X. Działalność dydaktyczna**

Od początku pracy zawodowej, po odbyciu kursu pedagogicznego, aktywnie uczestniczę w procesie dydaktycznym jednostki. Przez cały okres zatrudnienia prowadzę zajęcia z Fizjologii zwierząt ze studentami (studiów stacjonarnych i niestacjonarnych) Wydziałów:

- Medycyny Weterynaryjnej
- Agrobioinżynierii
- Biologii i Hodowli Zwierząt.

Prowadzę zajęcia z Fizjologii człowieka ze studentami studiów stacjonarnych i niestacjonarnych Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii.

Po uzyskaniu stopnia doktora powierzono mi przedmiot i prowadzę wykłady z zakresu Fizjologii człowieka dla studentów niestacjonarnych z Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii na kierunku Technologii Żywności i Żywienia Człowieka. Podczas wykładów korzystam z własnych prezentacji multimedialnych, samodzielnie przygotowuję materiały dydaktyczne na ćwiczenia dla studentów.

Uczestniczyłam w wymianie nauczycieli w ramach międzynarodowego programu Erasmus i odbyłam tygodniowy staż na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Kordobie w Hiszpanii.

## **XI. Działalność organizacyjna**

Dzięki osobistemu zaangażowaniu Zakład Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie otrzymał środki finansowe przyznane przez Komitet Badań Naukowych, co umożliwiło zakup nowoczesnego spektrofotometrycznego czytnika mikroplątek - Benchmark Plus wraz z programem Microplate manager Software Version 5.2.1. (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) oraz płuczki.



Od 2005 roku sprawuję opiekę na biblioteką Zakładu Fizjologii Zwierząt w Katedrze Biochemii i Fizjologii Zwierząt.

*Atomowski*