



PODPIS ZAUFANY

DAGMARA
WINIARCZYK
21.09.2023 18:24:12 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dagmara Winiarczyk

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie/Wydział Medycyny
Weterynaryjnej Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych
Zwierząt, Zakład Chorób Wewnętrznych Zwierząt
Towarzyszących

Wniosek

z dnia 20.09.2023 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie¹ weterynaria

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia
doktora habilitowanego:

Cykl publikacji pod wspólnym tytułem:
„Doskonalenie diagnostyki cukrzycy u psów ze szczególnym uwzględnieniem
proteomiki.”

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie
wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała
uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**^{*2}

Zostałem poinformowany, że:

*Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w
sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej
z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).*

*Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.
Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)
Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.
232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu
przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i
obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.*

*Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest
na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html*

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia dokumentu poświadczającego uzyskanie stopnia doktora
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
5. Ocena bibliograficzna
6. Publikacje wchodzące w skład cyklu
7. Oświadczenia autorów prac wchodzących w skład cyklu
8. Zaświadczenia potwierdzające odbycie stażu
9. Dodatkowe zaświadczenia



Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt

Zakład Chorób Wewnętrznych Zwierząt Towarzyszących

**Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria**

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Dagmara Winiarczyk

**Doskonalenie diagnostyki cukrzycy u psów
ze szczególnym uwzględnieniem proteomiki**

Lublin 2023

1. IMIĘ I NAZWISKO: Dagmara Winiarczyk (z domu Wyłupek)

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

2021 r., tytuł: specjalista chorób psów i kotów, nadany przez Komisję ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii przy Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Poddyplomowego w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach

2018 r., stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, specjalność – choroby wewnętrzne zwierząt, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 25 stycznia 2018 r.; tytuł rozprawy doktorskiej: „Przydatność proteomiki w rozpoznawaniu nefropatii różnego pochodzenia u psów”; promotor: dr hab. Jacek Madany, promotor pomocniczy: dr n. wet. Andrzej Milczak; recenzenci: prof. dr hab. Roman Lechowski, dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak

2011 r. , tytuł: lekarz weterynarii; dyplom lekarza weterynarii nr 51302 z dnia 21.04.2011 r., wydany przez Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

2011-2018 r.: asystent w Zakładzie Chorób Wewnętrznych Zwierząt Towarzyszących Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Od 2018 r.: adiunkt w Zakładzie Chorób Wewnętrznych Zwierząt Towarzyszących Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ.478 Z PÓŹN. ZM.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Doskonalenie diagnostyki cukrzycy u psów ze szczególnym uwzględnieniem proteomiki

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

P1. Winiarczyk D., Winiarczyk M., Balicki I., Szadkowski M., Michalak K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Proteomic analysis of tear film in canine diabetic patients with and without retinopathy. Journal of Veterinary Research 2022: 12, DOI: 10.2478/jvetres-2022-0053

Publikacja *open access*

Impact Factor: **1,800** , MNiSW: **140 pkt.**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, selekcji pacjentów i zebraniu prób od zwierząt, interpretacji uzyskanych wyników. Nadzorowałam przebieg badań, zebrałam piśmiennictwo, przygotowałam manuskrypt do publikacji i odpowiedzi na recenzje (autor korespondencyjny). Mój udział w pracy szacuję na 75%.

P2. Winiarczyk D., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Michalak K., Adaszek Ł., Proteomic analysis of tear film obtained from diabetic dogs. Animals, 2020: 10, 12, 2416, DOI: 10.3390/ani10122416

Publikacja *open access*

Impact Factor: **2.752**, MNiSW: **100 pkt.**

Liczba cytowań: **3**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, selekcji pacjentów i zebraniu prób od zwierząt, interpretacji uzyskanych wyników. Nadzorowałam przebieg badań,

przygotowałam manuskrypt do publikacji i odpowiedzi na recenzje (autor korespondencyjny).
Mój udział w pracy szacuję na 80%.

P3. Winiarczyk D., Winiarczyk M., Michalak K, Winiarczyk S., Adaszek Ł., Urinary proteome differences in canine diabetes with and without the presence of microalbuminuria. *Animals* 2022; 12, 6, 748, DOI: 10.3390/ani12060748

Publikacja *open access*

Impact Factor: **3.000**, MNiSW: **100 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, selekcji pacjentów i zebraniu prób od zwierząt, interpretacji uzyskanych wyników. Koordynowałam przebieg badań oraz przygotowałam manuskrypt do publikacji i odpowiedzi do recenzentów (autor korespondencyjny). Mój udział w pracy szacuję na 80%.

P4. Milczak A., Winiarczyk D., Winiarczyk S., Bochyńska D., Adaszek Ł., Winiarczyk M., Lechowski R., Procoagulant and anticoagulant plasma indicators in diabetic dogs showing increased antithrombin III levels in canine diabetes mellitus. *BMC Veterinary Research* 2022; 66, 108, DOI: 10.1186/s12917-022-03179-7

Publikacja *open access*

Impact Factor: **2.600**, MNiSW: **140 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, koordynowaniu projektu. Wytypowałam zwierzęta i pobrałam od nich materiał. Wspólnie z pierwszym autorem dokonałam analizy uzyskanych wyników oraz brałam udział w opracowaniu manuskryptu i odpowiedzi do recenzentów (autor korespondencyjny). Mój udział w pracy szacuję na 60%.

Wyniki badań przedstawione w publikacjach P1-P4 były w całości (P1, P2, P4) lub w części (P3) finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium 2016/23N/NZ5/02576, którego byłam kierownikiem.

Łączna punktacja 4 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem ich opublikowania, wynosi:

- według listy czasopism punktowanych MNiSW: **480 pkt.**
- sumaryczny Impact Factor (IF) według listy JCR: **10,152**

Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się w załącznikach 6 i 7.

4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Cukrzyca to heterogenna grupa chorób metabolicznych charakteryzujących się występowaniem przewlekłej hiperglikemii, wynikającej z zaburzenia wydzielania lub działania insuliny. Choroba dotyka ludzi i wiele różnych gatunków zwierząt domowych oraz dzikich (Dash and Dash, n.d.). Według różnych danych na cukrzycę choruje od 0,0013 do 1,2% populacji psów (Fall et al., 2007; Niaz et al., 2018; Tardo et al., 2019). Pod względem etiologii, patogenezy i przebiegu cukrzyca psów jest bardzo zbliżona do cukrzycy typu 1 u ludzi, czyli cukrzycy insulinozależnej (IDDM, insulin-dependent mellitus), ale zdarza się też odpowiednik cukrzycy ciężarnych (Nelson and Reusch, 2014). Choroba cechuje się obniżonym poziomem endogennej insuliny w surowicy krwi po podaniu czynnika wpływającego na jej wydzielanie (np. glukozy lub glukagonu), trudnościami w kontrolowaniu glikemii dietą lub doustnymi środkami hipoglikemicznymi, a także wymaga podawania egzogennej insuliny. Mediana przeżywalności dla psów leczonych insuliną wynosi od kilku miesięcy do trzech lat (Mattin et al., 2014; Tardo

et al., 2019). U ludzi wskaźniki przeżywalności są z oczywistych względów znacznie wyższe, ale u chorych na cukrzycę ryzyko zgonu wzrasta dramatycznie wraz z wystąpieniem w zaawansowanych stadiach choroby powikłań mikro- i makronaczyniowych (Teni et al., 2019). Pomimo intensywnego rozwoju medycyny weterynaryjnej, niewystarczająca jest liczba prac nad wczesną diagnostyką pacjentów chorujących na cukrzycę. Obecnie główne kierunki badań zmierzają do wytypowania markerów, które umożliwiłyby wczesne rozpoznanie powikłań układowych, takich jak retinopatia, nefropatia czy zaburzenia krzepnięcia, zanim rozwiną się objawy kliniczne. Poprawiłoby to skuteczność leczenia pacjentów z cukrzycą lub zapobiegałoby rozwojowi nieodwracalnych zmian, takich jak np. przewlekła choroba nerek.

Jako klinicysta obserwowałam w swojej pracy wiele przypadków cukrzycy u psów, u których powikłania układowe zdarzały się bardzo często i miały znaczący wpływ na efekt leczenia.

W 2017 roku rozpoczęłam badania nad proteomem filmu łzowego u psów z cukrzycą, które realizowałam w ramach Projektu Preludium, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego byłam kierownikiem. W czasie 5 lat trwania projektu w gabinecie Kliniki Chorób Wewnętrznych leczono ponad 200 psów z cukrzycą.

W pierwszej fazie realizacji projektu celem była identyfikacja białek wchodzących w skład filmu łzowego u psów z naturalnie przebiegającą cukrzycą. Opracowanie pierwszego pełnego proteomu filmu łzowego psów z cukrzycą było istotne w kontekście kolejnych badań nad identyfikacją potencjalnych biomarkerów charakterystycznych dla tej choroby i towarzyszących jej powikłaniom. Wyniki analizy proteomicznej filmu łzowego u pacjentów cukrzycowych przedstawiłam w publikacji P2.

W drugiej fazie przedmiotem badań była retinopatia cukrzycowa. Inspiracją do podjęcia tego kierunku badań były zaobserwowane w trakcie własnej praktyki klinicznej zmiany w siatkówce oka psów z cukrzycą podobne do opisywanych w dostępnym piśmiennictwie. Zgrubienie błony podstawnej naczyń włosowatych siatkówki to powszechnie występująca wczesna zmiana w

retinopatii cukrzycowej u człowieka i modeli zwierzęcych, która pojawia się w przeciągu 6 miesięcy od wystąpienia tej choroby (Gardiner et al., 2003). Publikacje z zakresu praktyki klinicznej wskazują, że w relatywnie krótkim czasie, bo średnio po 17 miesiącach od początku wystąpienia naturalnej cukrzycy, u co najmniej 22% psów rozwijają się zmiany w siatkówce w postaci mikrotętniaków i krwawień (Kobayashi et al., 1998; Landry et al., 2004). Na podstawie tych przesłanek wysunęłam hipotezę, że zmiany w siatkówce mogą pociągać za sobą zmiany w składzie białkowym filmu łzowego, które mogą mieć wartość diagnostyczną lub terapeutyczną i być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów patofizjologicznych leżących u podłoża tej choroby. Porównywanie prawidłowego profilu białkowego filmu łzowego z profilem pojawiającym się w przebiegu danej choroby jest metodą prowadzącą do selekcji potencjalnych biomarkerów diagnostycznych i terapeutycznych. Okazało się to dużym wyzwaniem, bowiem u psów z cukrzycą w krótkim czasie od rozpoznania dochodziło do zmętnienia soczewki oka, które uniemożliwiało rozpoznanie retinopatii. Z tego względu projekt został przedłużony o rok. W rezultacie udało nam się wyselekcjonować grupę psów z cechami retinopatii cukrzycowej, u których nie rozwinęły się jeszcze zmiany w soczewce oka. Wyniki analizy proteomicznej filmu łzowego u pacjentów cukrzycowych z retinopatią przedstawiłam w publikacji P1.

Do przeprowadzenia analizy proteomicznej zastosowałam elektroforezę 2D w żelu poliakrylamidowym w kombinacji ze spektrometrią mas. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu akrylamidowym jest klasyczną metodą rozdziału złożonych mieszanin białkowych. Od wielu dekad jest stosowana w ocenie ekspresji białek w komórkach, tkankach i płynach ustrojowych (Banach et al. 2013; Gorg et al. 2004; Saraygord-Afshari 2015). W pierwszym kierunku białka rozdzielane są w oparciu o wartość punktu izoelektrycznego na paskach żelowych z ustalonym zakresem pH, natomiast w drugim kierunku ich rozdział podlega separacji w oparciu o masę cząsteczki białkowej. Po zakończonej elektroforezie wzór białkowy wydobywa się poprzez

barwienie srebrem. Z uzyskanego profilu białkowego można wnioskować o ciężarze cząsteczkowym poszczególnych frakcji białkowych i ich punkcie izoelektrycznym. Przez porównanie dwóch elektroforez z tkanek prawidłowych i patologicznych za pomocą programów bioinformatycznych udaje się wyznaczyć białka różnicujące, które są potencjalnymi markerami danego procesu patologicznego (Berth et al. 2007). Identyfikacja białek różnicujących wymaga zastosowania spektrometrii mas, która w ostatnich latach przeżywa dynamiczny rozwój, szczególnie w proteomice (de la Cuesta 2017).

Materiałem do badań były próbki filmu łzowego pobrane za pomocą pasków Schirmera. Film łzowy pokrywający powierzchnię oka jest złożonym płynem ustrojowym zawierającym tysiące cząsteczek o różnej strukturze i funkcji. Analiza molekularna jego składu jest źródłem informacji użytecznych w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu nie tylko chorób oka, ale także chorób układowych u człowieka (Brandt et al., 2014; Herber et al., 2002; Saraygord-Afshari et al., 2015). Obecnie w literaturze światowej jest niewiele publikacji z zakresu proteomiki filmu łzowego zwierząt, a zwłaszcza psów (de Freitas Campos et al., 2008), żyjących w tych samych warunkach co człowiek i często zapadających na choroby o bardzo podobnej etiopatogenezie. Pomimo bardzo dobrze rozwiniętej okulistyki weterynaryjnej w odniesieniu do psów, piśmiennictwo światowe z zakresu badań molekularnych filmu łzowego jest skąpe. Większość informacji odnoszących się do profilu białkowego pochodzi jeszcze z okresu, kiedy dokładność uzyskiwanych wyników była w znacznej mierze ograniczona stosowanymi metodami analitycznymi.

Przeprowadzone badania były idealnym połączeniem moich zainteresowań naukowych i klinicznych. Kierowany przeze mnie Projekt Preludium był kontynuacją badań proteomicznych filmu łzowego, które rozpoczął w 2015 roku. Wówczas jako pierwszy zespół badawczy na świecie przedstawiliśmy wyniki dogłębnej analizy proteomu filmu łzowego u zdrowego psa. Praca została opublikowana w czasopiśmie PLOS ONE (Winiarczyk M., Winiarczyk D.,

Banach T., Adaszek Ł., Madany J., Mackiewicz J., Pietras-Ozga D., Winiarczyk S., Dog Tear Film Proteome In-Depth Analysis, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144242>; December 23, 2015) i ma wysoki wskaźnik cytowań. Nasz zespół został uznany za ośrodek referencyjny proteomiki mikrobiologicznej (biotyping) przez firmę Bruker Daltonics, a także zaproszony do współtworzenia bazy danych na platformie ProteoExchange.

Podjęte przez nasz zespół zadanie opracowania proteomu filmu łzowego u psów z cukrzycą i cukrzycową retinopatią zostało przychylnie przyjęte w środowisku lekarzy medycyny człowieka zajmujących się okulistyką doświadczalną, jak również wśród lekarzy weterynarii. Publikacje powstałe w wyniku badań własnych są cytowane, a wyniki prezentowane na międzynarodowych kongresach zostały wysoko ocenione i wzbudziły zainteresowanie naukowców medycyny ludzkiej. Nasz zespół analiz proteomicznych podjął szeroką współpracę z innymi jednostkami naukowymi, między innymi z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie i Uniwersytetem Wschodniej Finlandii w Kuopio.

Dzięki przeprowadzonym badaniom potwierdziliśmy tezę, że film łzowy psów jest źródłem cennych biomarkerów retinopatii cukrzycowej. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki są powtarzalne, a jakościowy i ilościowy rozkład białek różnicujących wskazuje na faktyczne różnice pomiędzy badanymi grupami. Ich dogłębna analiza w znaczący sposób ułatwia wgląd w patogenezę rozwoju retinopatii cukrzycowej. Daje to podstawy do stworzenia szybkich i wiarygodnych testów przesiewowych i w konsekwencji wdrożenia wczesnego leczenia.

Podsumowując należy podkreślić, że są to pierwsze badania proteomu filmu łzowego u psów z cukrzycą, a wyniki przedstawione w publikacjach P1 i P2, które udało mi się uzyskać w czasie trwania projektu, to:

- 1) opracowanie wiarygodnej i powtarzalnej metodyki pobierania, przechowywania i analizy proteomicznej filmu łzowego u psów;

2) wytypowanie potencjalnych zestawów biomarkerów białkowych w filmie łzowym psów z cukrzycą i cukrzycową retinopatią;

3) poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat etiopatologii cukrzycy i rozwoju retinopatii cukrzycowej u psów.

W 2022 roku badania zostały zakończone, a rok później w wyniku oceny merytorycznej zespół ekspertów pozytywnie ocenił końcowy efekt i projekt został zakończony formalnie.

Dzięki funduszom uzyskanym w ramach projektu zrealizowano 8 prac, z których 6 zostało opublikowanych w czasopismach z listy JCR. Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji z projektu wynosi 14,24. Jako kierownik grantu przedstawiłam 5 wystąpień zjazdowych, w tym na najbardziej prestiżowym europejskim kongresie okulistycznym EVER (na którym otrzymałam wyróżnienie i nagrodę), jak również na Światowym Szczycie Diabetologicznym World Summit of Diabetes.

Z uwagi na moje wcześniejsze doświadczenia związane z badaniami proteomicznymi i opracowaną podczas doktoratu metodykę analizy proteomu moczu, w kolejnych etapach pracy naukowej postanowiłam skupić się na dokładnej analizie proteomu moczu u pacjentów cukrzycowych. Cukrzycowa choroba nerek (nefropatia cukrzycowa) zaliczana jest do przewlekłych naczyniowych powikłań cukrzycy. Schorzenie zaliczane jest do mikroangiopatii, ale dokładna etiologia nie jest do końca poznana. Niewiele jest danych dotyczących dokładnej jej prevalencji (Herring et al., 2014; Muñana, 1995) . Morfologicznie cechuje się początkowo pogrubieniem błony podstawnej włósniczek kłębuszków nerkowych i powiększeniem obszaru mezangium wskutek nagromadzenia macierzy pozakomórkowej. Prowadzi to do przerostu kłębuszków i nerek oraz zaburzeń hemodynamiki nerkowej, zwiększonego wydalania albumin w moczu, a następnie do postępującego rozlanego lub ogniskowego stwardnienia kłębuszków z rozwojem zmian cewkowo-śródmiąższowych i upośledzeniem czynności nerek. Cukrzycowa choroba nerek powoduje zarówno zmiany morfologiczne, jak i zmiany czynnościowe w

nerkach wywołane bezpośrednio przez cukrzycę. Zmiany te pojawiają się u psów w różnym wieku i powodują uszkodzenie włósniczek kłębuszka nerkowego, które jest wynikiem długotrwałego, zwiększonego stężenia glukozy we krwi (Hoenig, 2002).

Wczesne objawy cukrzycowej choroby nerek mogą być niezauważone. Istnieją doniesienia, że u 20 % psów chorujących na cukrzycę obserwowany jest białkomocz (na podstawie wskaźnika UPC > 1), natomiast u 46 % nadciśnienie (Struble et al., 1998). Wczesny marker uszkodzenia nerek – albuminuria występowała u 55% psów z cukrzycą (Mazzi et al., 2008). Warto zaznaczyć, że objaw zwiększonej obecności albumin (na poziomie mikroalbuminurii) w moczu może nie zostać uwidoczniiony w rutynowym badaniu klinicznym. W jednej z opublikowanych prac autorzy przedstawiają wyniki badania moczu u psów z cukrzycą, u których występowała mikroalbuminuria przy prawidłowym poziomie stosunku białka do kreatyniny w moczu (UPC) (Muñana, 1995). Obecnie rutynowa ocena funkcji nerek oparta jest na oznaczaniu niebiałkowych związków azotowych (kreatynina, mocznik), które są endogennymi wskaźnikami wielkości przesączania kłębuszkowego (GFR). Przyjmuje się, że dopiero utrata co najmniej 75% masy nefronów wywołuje wzrost stężenia kreatyniny powyżej prawidłowego zakresu. Dlatego ciężar badań w nefrologii zogniskowany jest aktualnie na poszukiwaniu czułych i specyficznych markerów uszkodzenia nerek, które umożliwiają wczesne rozpoznanie zaburzeń funkcji nefronów, jeszcze przed pojawianiem się klinicznych objawów chorobowych. Od tego momentu bowiem choroba przybiera postać przewlekłej choroby nerek, a zmiany mają już jedynie charakter postępowy, nieodwracalny i różnie rozłożony w czasie. Zakłada się, że postępy w dziedzinie diagnostyki nefrologicznej umożliwią wcześniejsze wdrożenie i skuteczniejsze postępowanie terapeutyczne prowadzące do zatrzymania lub spowolnienia zmian w kłębuszkach lub kanalikach nerkowych.

W kolejnej pracy została dokonana analiza proteomu moczu u pacjentów cukrzycowych w celu wytypowania potencjalnych biomarkerów dla nefropatii rozwijającej się w przebiegu tej

choroby. W tym celu porównano proteom moczu pacjentów z cukrzycą, u których występowała mikroalbuminuria (wczesny marker uszkodzenia nerek), z proteomem moczu pacjentów cukrzycowych bez mikroalbuminurii. Wyniki zostały przedstawione w publikacji P3.

Kolejnym mało poznanym dotychczas, lecz jakże istotnym powikłaniem cukrzycowym są zmiany w układzie krzepnięcia, które również zaobserwowałam u części pacjentów cukrzycowych realizując projekt Preludium. Przewlekła hiperglikemia odgrywa istotną, jeśli nie wiodącą rolę w patogenezie tych zaburzeń, jest bowiem czynnikiem prozakrzepowym (Erem et al., 2005). Patofizjologia stanu nadkrzepliwości w cukrzycy jest złożona i nie w pełni wyjaśniona (Madan et al., 2010; Zhang et al., 2016). Do zwiększenia aktywności prozakrzepowej przyczynia się tu z pewnością wzrost stężenia fibrynogenu, czynnika VII, inhibitora fibrynolizy (PAI-1) oraz spadek stężenia naturalnych antykoagulantów (białko C i S) (Erem et al., 2005; Madan et al., 2010; Sobczak and Stewart, 2019). Sporo kontrowersji budzi natomiast rola i zachowanie się w przebiegu cukrzycy innego, bardzo istotnego antykoagulantu – antytrombiny III (ATIII). W różnych badaniach stwierdzano w osoczu chorych na cukrzycę zarówno niskie, prawidłowe, jak i podwyższone stężenia ATIII (Addai-Mensah et al., 2019; Dash and Dash, n.d.; Erem et al., 2005; Hamulu et al., n.d.; Madan et al., 2010; Mekki Mohammad O. et al., 1992; Sobczak and Stewart, 2019; Zhang et al., 2016).

W pracy P4 podjęliśmy badania, których celem było określenie wybranych parametrów układu hemostazy osoczowej, a w szczególności aktywności ATIII u psów chorujących na cukrzycę. Reasumując, cykl powiązanych ze sobą tematycznie publikacji stanowiących podstawę do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego obejmuje badania nad identyfikacją potencjalnych biomarkerów powikłań u pacjentów z retinopatią cukrzycową, nefropatią cukrzycową i zaburzeniami krzepnięcia.

4.3.1. Opis szczegółowy prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem wyników

Praca P1

Winiarczyk D., Winiarczyk M., Balicki I., Szadkowski M, Michalak K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Proteomic analysis of tear film in canine diabetic patients with and without retinopathy. Journal of Veterinary Research 2022: 12, DOI: 10.2478/jvetres-2022-0053

Analiza proteomiczna stała się ważnym narzędziem w badaniach biomedycznych i weterynaryjnych. Film łzowy pokrywający powierzchnię oka jest złożonym płynem ustrojowym zawierającym tysiące cząsteczek o różnej strukturze i funkcji. Jego głównym zadaniem jest ochrona, nawilżanie i odżywianie. W cukrzycy dochodzi do znaczących zmian w składzie filmu łzowego, które można wykazać testem Schirmera, testem czasu przerwania filmu łzowego (BUT), barwieniem fluoresceinowym, różem bengalskim i zielenią lizaminową. Stopień zaburzenia składu powierzchniowego filmu łzowego jest ściśle powiązany z rozwojem choroby dotyczącej siatkówki – retinopatii, im większe odchylenia w przywołanych testach, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia jej formy proliferacyjnej. Dodatkowo, za pomocą spojówkowej cytologii impresyjnej, wykazano wyższy stopień metaplazji płaskonabłonkowych ze współistniejącym zmniejszeniem ilości komórek kubkowych u psich pacjentów z cukrzycą. Wszystkie te zmiany są odzwierciedleniem zaburzeń równowagi metabolicznej w przebiegu tej choroby (Nishida 2005). Analiza molekularna składu filmu łzowego jest źródłem informacji użytecznych w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu nie tylko chorób oka, ale także chorób układowych u człowieka (Boehm et al., 2013; Herber et al., 2002; Saraygord-Afshari et al., 2015). Lipokalinę 1, laktotransferynę, lizozym C, lipofilinę A i łańcuchy lambda immunoglobulin zidentyfikowano jako możliwe biomarkery retinopatii cukrzycowej. W łzach pacjentów z tym schorzeniem ich poziom był relatywnie wysoki. W

grupie cukrzyków, w porównaniu z osobnikami zdrowymi, notowano różnego stopnia ekspresję białek LCN-1, HSP27, B2M. Poziom tej ekspresji może być użytecznym biomarkerem retinopatii cukrzycowej. Oprócz przydatności klinicznej, identyfikacja biomarkerów może mieć zastosowanie w opracowywaniu nowych cząsteczek aktywnych farmakologicznie i testów diagnostycznych (Grus et al., 2007; Zhou et al., 2012).

Celem badań była identyfikacja białek wchodzących w skład filmu łzowego u psów z naturalnie przebiegającą cukrzycą, u których wykazano cechy retinopatii cukrzycowej.

Badania zostały przeprowadzone w Innowacyjnym Centrum Patologii i Terapii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie, we współpracy z Kliniką Okulistyki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Psy wytypowano w oparciu o dane z wywiadu i wyniki badań klinicznych, w tym pełnego badania okulistycznego z użyciem lampy szczelinowej, fundus kamery i optycznej koherentnej tomografii siatkówki, badania biochemicznego surowicy krwi, badania hematologicznego, badania moczu. Na podstawie uzyskanych wyników pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy: a) grupa psów kontrolnych bez objawów okulistycznych, niewykazujących także żadnych innych objawów chorobowych (n = 12); b) grupa psów z cukrzycą, z glikemią na czczo ≥ 11 mmol/l (200 mg/dl), cukromoczem, bez zmian w siatkówce (n = 12); c) grupa psów z cukrzycą, z glikemią na czczo ≥ 11 mmol/l (200 mg/dl), cukromoczem, ze zmianami w siatkówce określonymi za pomocą optycznej koherentnej tomografii i w oparciu o kolorowe zdjęcia z fundus kamery (n = 8). Materiałem do badań był film łzowy pobrany na paski Schirmera, wyeluowany do buforu mocznikowego, zagęszczony i odsolony. W kolejnym etapie dokonano rozdziału białek przy użyciu elektroforezy 2D. Wstępną analizę jakościową i ilościową przeprowadzono na podstawie porównania wzorów elektroforetycznych próbek filmu łzowego od psów z cukrzycą ze zmianami w siatkówce i bez tych zmian oraz psów zdrowych z dostępnymi komercyjnie standardami białkowymi. W końcowym etapie przeprowadzono sekwencjonowanie białek przy

użyciu techniki MALDI-TOF z fragmentacją MS/MS w celu ich identyfikacji. Uzyskane profile białkowe analizowano bioinformatycznie używając oprogramowania dostępnego na serwerze Mascot i w sieci internetowej, takiego jak DAVID i VENNY.

W rezultacie badań stwierdzono 489 plamek (spotów) w żelu poliakrylamidowym wspólnych dla obu grup psów z cukrzycą i grupy kontrolnej. Wśród nich 11, których nasilenie ekspresji różniło się istotnie w porównaniu z pozostałymi spotami ($P \leq 0.05$), wycięto z żelu elektroforetycznego i poddano identyfikacji przy użyciu MALDI-TOF/TOF-MS. Ostatecznie zidentyfikowano 5 białek. Ekspresja czterech białek była podwyższona (upregulated) w obu grupach psów z cukrzycą, a mianowicie: Ras-related protein Rab-13; aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3); 28S ribosomal protein S31, mitochondrial; i 60S ribosomal protein L5. Natomiast białko 2'-5'-oligoadenylate synthase 3 wykazywało obniżoną ekspresję (downregulated) u pacjentów cukrzycowych. Według systemu klasyfikacji Panther (panther.org) były to białka o aktywności katalitycznej, regulacyjnej i białka wiążące.

W przebiegu cukrzycy stan hiperglikemii indukuje stres oksydacyjny, który z kolei wpływa uszkadzająco na komórki siatkówki poprzez aktywację szlaków: białka kinazy C, heksozaminy i odkładanie wewnątrzkomórkowo zaawansowanych końcowych produktów glikacji (Hammes, 2018). Długotrwały stres oksydacyjny wraz z upośledzonym procesem autofagii jest ściśle powiązany ze stanem zapalnym, który z kolei odgrywa kluczową rolę w patogenezie retinopatii cukrzycowej (Hammes, 2018). Argumentem na poparcie tej tezy są wyniki badań własnych, w których zaobserwowano w filmie łożowym u pacjentów z cukrzycą podwyższoną ekspresję białek związanych z procesami zapalnymi: Ras-related protein Rab-13; AKR1C3; 28S ribosomal protein S31, mitochondrial; i 60S ribosomal protein L5. Jednak na szczególną uwagę zasługuje zidentyfikowane przez nas białko AKR1C3, ponieważ jego ekspresja była istotnie wyższa w grupie psów z retinopatią w porównaniu z grupą bez zmian na siatkówce. AKR1C3 należy do białek enzymatycznych, które zostało oznaczone w różnych tkankach zdrowych i

patologicznych, w tym w centralnym układzie nerwowym. AKR1C3 bierze udział w metabolizmie m.in. cukrów, sterydów i prostaglandyn (Penning, 2019), w rezultacie którego wzrasta poziom reaktywnych form tlenu, co prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia DNA. W dostępnym piśmiennictwie nie ma doniesień na temat roli tego białka w patogenezie komplikacji okulistycznych u pacjentów cukrzycowych. Istnieje natomiast publikacja, w której autorzy sugerują możliwy udział białka 3 α -HSDs, które jest izoformą AKR1C3, w patogenezie jaskry u ludzi (Agapova et. al., n.d.). Podwyższona ekspresja białka AKR1C3 w filmie łzowym u psich pacjentów z retinopatią cukrzycową w naszych badaniach dostarcza nowych danych na temat możliwości udziału neurosteroidów w patogenezie zmian w siatkówce w przebiegu cukrzycy.

Jak już wspomniano, cukrzyca indukuje stres oksydacyjny w siatkówce, który uszkadza jej mitochondria, przyspieszając apoptozę komórek naczyń włosowatych (Kowluru et al., 2014). Kluczowymi elementami w aktywacji tego procesu są białka Ras. W naszych badaniach białko Ras-related protein Rab-13 wykazywało podwyższoną ekspresję w filmie łzowym w obu grupach pacjentów cukrzycowych w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w grupie psów z retinopatią ekspresja ta była istotnie wyższa niż u pacjentów z cukrzycą bez retinopatii. Na tej podstawie można domniemywać, że białko Ras-related protein Rab-13 może być powiązane z rozwojem retinopatii cukrzycowej u psa i traktowane jako potencjalny marker i cel terapeutyczny w nowych strategiach leczenia.

Całościowa analiza proteomiczna przeprowadzona w badaniach własnych potwierdziła wcześniej postawioną tezę, że procesy patologiczne w siatkówce w przebiegu cukrzycy u psów powodują zmiany w proteomie filmu łzowego.

Nasze badania są pierwszymi doniesieniami na temat zmian proteomu łez u psów z retinopatią cukrzycową. Jestem przekonana, że otrzymane wyniki będą stanowić punkt odniesienia do kolejnych badań nad tą chorobą.

Praca P2

Winiarczyk D., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Michalak K., Adaszek Ł., Proteomic analysis of tear film obtained from diabetic dogs. *Animals* 2020: 10, 12, 2416, DOI: 10.3390/ani10122416

Cukrzyca zwierząt towarzyszących jest znaczącą przyczyną obniżenia jakości ich życia. Niezależnie od różnic w obrazie klinicznym, który charakteryzuje przebieg cukrzycy tak u człowieka, jak i u zwierząt, najistotniejszym zadaniem w postępowaniu z chorym jest wczesne rozpoznanie i ograniczenie rozwoju powikłań układowych. W medycynie weterynaryjnej jest to nadal duże wyzwanie.

Celem badań było poszerzenie wiedzy na temat składu białkowego filmu łzowego u psa (proteomu filmu łzowego), a także identyfikacja wczesnych biomarkerów, które mogą być przydatne nie tylko w diagnostyce i leczeniu cukrzycy u psów, ale również do dalszych badań nad cukrzycą u ludzi z wykorzystaniem modelu psa. Należy podkreślić, że badania te zostały z powodzeniem przeprowadzane już u ludzi – pacjentów z cukrzycą, dostarczając wielu nowych informacji istotnych zarówno z klinicznego, jak i doświadczalnego punktu widzenia.

Badania przeprowadzono według następującego planu:

1. Wytypowanie zwierząt do badań (grupa psów z cukrzycą $n = 15$; grupa kontrolna $n = 13$) na podstawie wyników badań klinicznych, hematologicznych, biochemicznych surowicy krwi i badania moczu.
2. Pobranie filmu łzowego za pomocą pasków Schirmera od grupy zdrowych i grupy chorych na cukrzycę.
3. Przeprowadzenie rozdziału białek filmu łzowego metodą elektroforezy 2D.
4. Porównanie i analiza elektroforetycznych profili białkowych.
5. Identyfikacja wybranych frakcji białkowych metodą spektrometrii mas, techniką MALDI-TOF (MatrixAssisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight).

6. Analiza bioinformatyczna danych uzyskanych ze spektrometrii mas.

W wyniku analizy proteomicznej wytypowaliśmy 14 plamek różnicujących grupę psów z cukrzycą i grupę kontrolną przy poziomie istotności $p \leq 0.05$. Po wycięciu ich z żelu elektroforetycznego udało się pozytywnie zidentyfikować 9 białek. Programem Delta2D ekspresja 8 białek została oznaczona jako obniżona (downregulated), a jednego jako podwyższona (upregulated).

Jedynym białkiem wykazującym wyższą ekspresję w filmie łzowym psów z cukrzycą w porównaniu z grupą kontrolną było SRC kinase signaling inhibitor 1 (SRCIN1). Pozostałe białka: phosphatidylinositol-4 kinase type 2 alpha (PI4KII α), Pro-melanin concentrating hormone (Pro-MCH), Flotillin-1, Protein mono-ADP ribosyltransferase, GRIP i coiled coil domain containing protein 2, tetratricopeptide repeat protein 36, serpin i Prelamin A/C miały niższą ekspresję w filmie łzowym pacjentów cukrzycowych. Analizując molekularną funkcję powyższych białek systemem klasyfikacji Panther (<http://www.pantherdb.org>) wykazano, że były to białka katalityczne, wiążące i regulacyjne, należące do kategorii białek cytoszkieletu, metabolitów interkonwersji enzymów oraz białek łączących kwasy nukleinowe.

Na szczególną uwagę zasługuje jedyne białko o podwyższonej ekspresji w filmie łzowym u psów z cukrzycą – SRC kinase signaling inhibitor 1 (SRCIN1). Znane jest również jako p140 Cas-associated protein (p140CAP) i odpowiada za wyciszenie SRC kinazy, a następnie obniżenie aktywności niektórych szlaków sygnałowych, jak: szlak Ras/sygnał zewnątrzkomórkowej regulacji kinazy (ERK), szlak receptorowy naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) (Di Stefano et al., 2007) i szlak kinazy ogniskowej adhezji (FAK). Rodzina kinaz SRC bierze udział w aktywacji procesów związanych z czynnikiem wzrostu śródbłona naczyń (VEGF, vascular endothelial growth factor). Dowiedziono, że VEGF jest głównym białkiem uwalnianym przez ischemiczną siatkówkę w przebiegu cukrzycy u ludzi ze względu na uszkodzoną barierę krew-siatkówka. W konsekwencji prowadzi to do tworzenia

rewaskularyzacji siatkówki. Obecnie w terapii retinopatii cukrzycowych u ludzi stosuje się preparaty zawierające czynniki anty-VEGF w iniekcji doszkliskowej. W badaniach własnych podwyższona ekspresja SRC kinazy w filmie łożowym potwierdza możliwy udział tego białka w patologicznych procesach w siatkówce psów w przebiegu cukrzycy.

Przypuszcza się, że kluczową rolę w patogenezie cukrzycy u psów odgrywają procesy autoimmunologiczne. Badania własne przeprowadzone na psach z cukrzycą potwierdziły obecność w ich filmie łożowym białek powiązanych głównie z zapaleniem i stresem oksydacyjnym. Zidentyfikowane białka pełnią rolę m.in. w sygnałach międzykomórkowych, transporcie przez błonowy i wiązaniach z innymi molekułami.

Wnioskiem płynącym z przedstawionych badań własnych jest stwierdzenie, że pierwsze uszkodzenia na poziomie komórkowym w przebiegu cukrzycy psów mają swoje odzwierciedlenie w zmianach składu białkowego ich filmu łożowego, które są obserwowane jeszcze przed wystąpieniem ewidentnych symptomów choroby. Potwierdziliśmy tym samym występowanie u psa pewnych prawidłowości rozwoju cukrzycy, jakie wcześniej opisano u ludzi. Daje to możliwość wykorzystania uzyskanych wyników do dalszych badań nad patogenezą tej choroby na modelach psa.

Praca P3

Winiarczyk D., Winiarczyk M., Michalak K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Urinary proteome differences in canine diabetes with and without the presence of microalbuminuria. *Animals* 2022; 12, 6, 748, DOI: 10.3390/ani12060748

W moczu zawarte są informacje płynące z dużego krwioobiegu do wszystkich tkanek i narządów w postaci zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, białek i małych cząsteczek. W tej mieszaninie znajdują się zestawy białek charakterystycznych dla rozmaitych stanów chorobowych, które mogą być wykorzystane w diagnostyce, prognozowaniu i monitorowaniu leczenia.

Poszukiwanie tych unikatowych białek lub ich zespołów jest jednym z wielkich wyzwań współczesnej proteomiki z uwagi na fakt, że to białka, a nie informacja zapisana w genomie, dostarczają kompletnej wiedzy o aktualnym stanie zdrowia organizmu. Dla porównania można przytoczyć fakt, że na podstawie ekspresji genów na poziomie transkryptomu można przewidzieć pojawienie się tylko połowy form białkowych wynikających między innymi z potranslacyjnych modyfikacji. Wielokierunkowe działania białek w skomplikowanych i dynamicznie zmieniających się konfiguracjach sprawiają, że poszukiwanie biomarkerów jest niezwykle trudnym, pracochłonnym i kosztownym przedsięwzięciem. W medycynie ludzkiej istnieje wiele publikacji dotyczących proteomiki moczu, również u pacjentów chorujących na cukrzycę. Zgodnie z aktualną wiedzą przedstawione badania własne opublikowane w pracy P3 są pierwszymi doniesieniami na temat proteomicznej analizy moczu pochodzącego od psów z cukrzycą.

Celem badań było wykazanie różnic pomiędzy profilami białkowymi moczu pacjentów cukrzycowych z mikroalbuminurią, bez mikroalbuminurii i zdrowych osobników oraz wytypowanie białek-markerów różnicujących.

Pacjentów cukrzycowych podzielono na podstawie dokładnych badań laboratoryjnych na dwie grupy: I grupę tworzyły psy z cukrzycą i mikroalbuminurią, II grupę – psy chorujące na cukrzycę, ale nie wykazujące objawów mikroalbuminurii. Grupę kontrolną stanowiły psy klinicznie zdrowe ($n = 7$). Materiałem do badań był mocz pobrany łącznie od 21 psów, po 7 prób z każdej grupy pacjentów.

Poddano analizie proteom moczu pobranego od wszystkich pacjentów z poszczególnych grup. W tym celu próbki moczu zostały rozdzielone w dwukierunkowej elektroforezie. Uzyskane profile elektroforetyczne białek moczu prawidłowego porównano z odpowiadającymi im profilami moczu patologicznego. Następnie nałożone obrazy wzorów elektroforetycznych poddano analizie bioinformatycznej w celu wytypowania frakcji białkowych różnicujących

poszczególne stany chorobowe. Stwierdzono 286 wspólnych plamek elektroforetycznych dla trzech grup pacjentów, w których zidentyfikowano pięć białek różnicujących za pomocą spektrometrii mas.

Dzięki zastosowaniu programu Delta2D możliwa była ilościowa ocena ekspresji otrzymanych białek. Białko Zinc Finger Protein 2 wykazało podwyższoną ekspresję w grupie pacjentów cukrzycowych z mikroalbuminurią, podczas gdy poziom tego białka w grupie pacjentów cukrzycowych bez mikroalbuminurii i zdrowych był taki sam. Na tej podstawie można przypuszczać, że białko Zinc Finger Protein 2 odgrywa istotną rolę w procesie inicjowania zmian chorobowych nerek w przebiegu cukrzycy.

Cztery z pięciu białek o podwyższonej ekspresji (upregulated), a mianowicie Glutaredoxin-3, Haptoglobin, Zinc finger C2HC domain-containing protein 1A i Glutathione S-transferase Mu 1, były obecne w moczu pochodzącym od obu grup cukrzycowych.

Praca P4

Milczak A, **Winiarczyk D.**, Winiarczyk S., Bochyńska D., Adaszek Ł., Winiarczyk M., Lechowski R., Procoagulant and anticoagulant plasma indicators in diabetic dogs showing increased antithrombin III levels in canine diabetes mellitus. BMC Veterinary Research 2022: 66, 108, DOI: 10.1186/s12917-022-03179-7

Antytrombina III jest jednołańcuchową glikoproteiną zaliczaną do rodziny proteaz serynowych, tzw. serpin. Syntetyzowana jest głównie w wątrobie, ale również w komórkach śródbłonna naczyń, megakariocytach i płytkach krwi. Okres jej półtrwania jest dość krótki i wynosi u psów 1,7 dnia (Kitrell and Berkitt, 2012). Zasadnicza rola AT III polega na hamowaniu układu krzepnięcia. Antytrombina III inaktywuje trombinę, ale także czynniki: Xa, XIIa, XIa, IXa, a w obecności heparyny także czynnik VIIa (Addai-Mensah et al., 2019; Dash and Dash, n.d.; Kitrell and Berkitt, 2012).

Celem badań była ocena aktywności wybranych parametrów hemostazy osoczowej u psów z cukrzycą.

Materiał do badań stanowiła krew pochodząca od 20 psów różnych ras, leczonych w dwóch dużych lecznicach weterynaryjnych zachodniej Polski (16 zwierząt) oraz w Klinice Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (4 psy). Jedynym kryterium włączenia zwierząt do badanej grupy było rozpoznanie u nich cukrzycy typu I. Z badań wyłączono zwierzęta, u których cukrzyca była spowodowana endokrynopatiami innymi niż hipoinsulinemia (ropomacicze, zespół Cushinga), a także psy ze współistniejącymi chorobami nowotworowymi.

Materiałem porównawczym było osocze cytrynianowe, ubogopłytkowe pochodzące od 7 zdrowych zwierząt, których właściciele zgłosili się do Kliniki Chorób Wewnętrznych na badania profilaktyczne. We krwi chorych psów oznaczono wybrane parametry układu hemostazy osoczowej: PT, stężenie fibrynogenu i D-dimerów oraz aktywność ATIII. Próbkę krwi do oznaczania wymienionych wskaźników pobierano do probówek z 3,2% cytrynianem trójsodowym. Stężenie fibrynogenu oznaczano metodą PT pochodną. Stężenie D-dimerów oznaczano ilościowo metodą immunoturbidymetryczną a aktywność ATIII metodą amidolityczną z użyciem substratu chromogenego.

Wiek psów z grupy kontrolnej wynosił $5,6 \pm 1,7$ lat. Stężenia glukozy we krwi nie przekroczyły u żadnego z psów wartości 110 mg/dl. Wszystkie analizowane parametry mieściły się w zakresie norm fizjologicznych.

Średni wiek chorych psów, od których pozyskano materiał do badań wynosił $11,26 \pm 2,75$ lat.

Wyniki kontroli glikemii u badanych zwierząt nie były zadowalające. Poranna glikemia na czczo wahała się w przedziale od 223 do 444 mg/dl. Najniższą wartość PT – 6,1 s (INR 0,49) odnotowano u jednego psa. Stężenie fibrynogenu było podwyższone u 50% psów i zawierało się w przedziale od 326 do 1852 mg/dl. U pozostałych zwierząt nie przekroczyło górnej ani

dolnej granicy normy fizjologicznej. Stężenie D-dimerów wykraczało poza granicę punktu odcięcia dla wartości prawidłowych ($500 \mu\text{g/l}$) u 8 zwierząt. Podwyższone wartości stężeń D-dimerów zawierały się w przedziale od 512 do $1305 \mu\text{g/l}$.

Analiza statystyczna wykazała, że grupa zwierząt chorych różniła się od grupy kontrolnej jedynie pod względem aktywności ATIII ($p = 0,01018$). U 18 psów (90%) stwierdzono wysokie wartości aktywności ATIII, które wykraczały poza górną granicę przedziału wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Tylko w 2 próbkach (10%) wartości ATIII były nieznacznie niższe niż najwyższe zanotowane w grupie kontrolnej. W całej badanej grupie średnia wartość aktywności ATIII była wyższa niż w grupie kontrolnej o 23,4%. Wskazuje to na fakt, że w przypadku cukrzycy u psa ryzyko wystąpienia zakrzepicy jest niewielkie. Przyjmuje się, że wysokie ryzyko zakrzepicy obserwuje się przy wartościach aktywności ATIII poniżej 60% (Kuzi et al., 2010). Przy prawidłowych wartościach ATIII ryzyko to spada.

W większości badań przeprowadzonych u ludzi z cukrzycą typu 2 stwierdza się prawidłowe (Madan et al., 2010) lub obniżone poziomy ATIII (Addai-Mensah et al., 2019; Dash and Dash, n.d.). Autorzy kilku doniesień dotyczących cukrzycy typu 1 u ludzi stwierdzali jednak wysoką aktywność ATIII (Erem et al., 2005; Hamulu et al., n.d.; Mekki Mohammad et al., 1992).

W piśmiennictwie weterynaryjnym dane na temat częstości występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych u psów są bardzo fragmentaryczne (Lake-Bakaar et al., 2012; Laurenson et al., 2010). Dwa wyżej przywołane doniesienia dotyczą zakrzepicy tętniczej i żyłnej. Autorzy pierwszej publikacji opisali 31 przypadków występowania u psów zakrzepów w obrębie aorty brzusznej, ich pierwotną przyczyną były w większości choroby nerek. Tylko w jednym przypadku za przyczynę uznano cukrzycę (Lake-Bakaar et al., 2012). Druga publikacja opisywała 80 psów z zakrzepicą żył śledzionowych, przy czym cukrzyca występowała tylko u jednego i współistniała z zapaleniem trzustki (Laurenson et al., 2010). Nieliczne starsze badania potwierdzają występowanie w przebiegu cukrzycy u psów zespołu

nadkrzepliwości, charakteryzującego się wzrostem stężenia fibrynogenu, aktywności czynników VII, VIII, X, XI, XII, vWF oraz spadkiem stężenia białka C, S oraz ATIII (Kitrell and Berkwitt, 2012).

Wahania w zakresie stężeń PT, fibrynogenu i D-dimerów oznaczanych w badaniach własnych nie były statystycznie istotne. Nie stwierdzono także statystycznie istotnych zależności pomiędzy żadnymi z analizowanych parametrów. Wyniki tej części badań najłatwiej byłoby podsumować stwierdzeniem, że wpisują się one w spektrum zmian opisywanych u diabetyków. I tak, w pojedynczych próbkach osocza notowano umiarkowane skrócenie czasu protrombinowego, wysokie stężenia fibrynogenu, a także wysokie wartości D-dimerów. Podobne zmiany występują w stanach nadkrzepliwości u ludzi (Binay et al., 2017; Nakashima, 2002; Sobczak and Stewart, 2019), ale używanie terminu trombofili w odniesieniu do psów chorujących na cukrzycę przy obecnym stanie wiedzy nie jest prawidłowe. Ani przegląd piśmiennictwa, ani wyniki badań własnych nie dostarczają dowodów na zwiększoną częstość występowania zakrzepicy u psów chorujących na cukrzycę. Co więcej, analiza statystyczna nie wykazała w zakresie PT, stężenia D-dimerów i fibrynogenu różnic pomiędzy grupą badaną a grupą zwierząt zdrowych. Stwierdzone w badaniach własnych zwiększone stężenia D-dimerów i fibrynogenu notowane jest także w stanach zapalnych o zróżnicowanym podłożu (Kang et al., 2016; Pechlivani and Ajjan, 2018). W przypadku pacjentów z cukrzycą hiperglikemia jest czynnikiem prozapalnym; podwyższone stężenie glukozy we krwi prowadzi do upośledzenia aktywności śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) i nasilenia produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) oraz uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak Il-1, Il-6, TNF- α . Umiarkowany wzrost stężenia fibrynogenu może być także związany z wiekiem (Kitrell and Berkwitt, 2012).

Opublikowane wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie określić, jakie konkretne mechanizmy odpowiadają za wzrost aktywności ATIII w przebiegu cukrzycy u psów. Jedną z

hipotez jest domniemanie, że wysoka aktywność antytrombiny pełni w tym wypadku istotną rolę protekcyjną przed nadmierną aktywacją krzepnięcia. Niemniej jednak należy podkreślić, że jest to pierwsze doniesienie opisujące podwyższony poziom antytrombiny III u psów z cukrzycą.

4.3.2. Podsumowanie

Obecnie dane literaturowe dotyczące proteomicznej analizy płynów ustrojowych u psów z cukrzycą są nieliczne i cząstkowe. Jednakże proteomika jako metoda badawcza cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Daje ona bowiem możliwość tworzenia swoistych profili białkowych charakterystycznych dla danej choroby.

W badaniach własnych potwierdziliśmy tezę, że film łzowy i mocz psów są źródłem cennych biomarkerów cukrzycowych, w tym jej powikłań, takich jak retinopatia i nefropatia cukrzycowa. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki są powtarzalne, a jakościowy i ilościowy rozkład białek różnicujących umożliwia lepsze poznanie i zrozumienie procesów patologicznych leżących u podstawy pojawiania się i rozwoju tej choroby u psów.

Rozwój powikłań zatorowo-zakrzepowych u pacjentów cukrzycowych jest tematem bardzo obszernym i nadal o niewystarczająco poznanej etiologii. Analiza czynników krzepnięcia w badaniach własnych wykazała wzrost aktywności ATIII w przebiegu cukrzycy u psów. Na podstawie otrzymanych wyników przypuszczamy, że ATIII może być czynnikiem protekcyjnym, działającym przeciwzakrzepowo, którego aktywność uruchamiana jest w mechanizmie obronnym w przebiegu cukrzycy u psów.

4.3.3. Piśmiennictwo

Addai-Mensah, O., Annani-Akollor, M.E., Nsafoah, F.O., Fondjo, L.A., Owiredo, E.-W., Danquah, K.O., Duneeh, R.V., Amponsah, F.A., 2019. Effect of poor glycaemic control

- on plasma levels and activity of protein C, protein S, and antithrombin III in type 2 diabetes mellitus. PLOS ONE 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223171>
- Binay, C., Bozkurt Turhan, A., Simsek, E., Bor, O., Akay, O.M., 2017. Evaluation of Coagulation Profile in Children with Type 1 Diabetes Mellitus Using Rotational Thromboelastometry. Indian J. Hematol. Blood Transfus. 33, 574–580. <https://doi.org/10.1007/s12288-017-0793-0>
- Boehm, N., Funke, S., Wiegand, M., Wehrwein, N., Pfeiffer, N., Grus, F.H., 2013. Alterations in the tear proteome of dry eye patients--a matter of the clinical phenotype. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54, 2385–2392. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8751>
- Dash, S., Dash, R.J., n.d. Levels of Natural Anticoagulants, Antithrombin Iii And Protein C In Diabetes Vascular Disease.
- Di Stefano, P., Damiano, L., Cabodi, S., Aramu, S., Tordella, L., Praduroux, A., Piva, R., Cavallo, F., Forni, G., Silengo, L., Tarone, G., Turco, E., Defilippi, P., 2007. p140Cap protein suppresses tumour cell properties, regulating Csk and Src kinase activity. EMBO J. 26, 2843–2855. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601724>
- Dihazi, H., Müller, G.A., Lindner, S., Meyer, M., Asif, A.R., Oellerich, M., Strutz, F., 2007. Characterization of Diabetic Nephropathy by Urinary Proteomic Analysis: Identification of a Processed Ubiquitin Form as a Differentially Excreted Protein in Diabetic Nephropathy Patients. Clin. Chem. 53, 1636–1645. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.088260>
- Engerman, R.L., Kern, T.S., 1987. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. Diabetes 36, 808–812. <https://doi.org/10.2337/diab.36.7.808>
- Erem, C., Hacıhasanoğlu, A., Çelik, Ş., Ovalı, E., Ersöz, H.Ö., Ukinç, K., Deger, O., Telatar, M., 2005. Coagulation and Fibrinolysis Parameters in Type 2 Diabetic Patients with and

- without Diabetic Vascular Complications. *Med. Princ. Pract.* 14, 22–30.
<https://doi.org/10.1159/000081919>
- Fall, T., Hamlin, H.H., Hedhammar, A., Kämpe, O., Egenvall, A., 2007. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1209–1216. <https://doi.org/10.1892/07-021.1>
- Gardiner, T.A., Anderson, H.R., Degenhardt, T., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Archer, D.B., Stitt, A.W., 2003. Prevention of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic dogs by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Diabetologia* 46, 1269–1275.
<https://doi.org/10.1007/s00125-003-1147-z>
- Grus, F.H., Joachim, S.C., Pfeiffer, N., 2007. Proteomics in ocular fluids. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 876–888. <https://doi.org/10.1002/prca.200700105>
- Hammes, H.-P., 2018. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia* 61, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4435-8>
- Hamulu, F., Kabalak, T., Özgen, A.G., n.d. The Level of Antithrombin III (AT III) in Turkish Diabetics 4.
- Herber, S., Grus, F.H., Sabuncuo, P., Augustin, A.J., 2002. Changes in the tear protein patterns of diabetic patients using two-dimensional electrophoresis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 506, 623–626.
- Herring, I.P., Panciera, D.L., Werre, S.R., 2014. Longitudinal Prevalence of Hypertension, Proteinuria, and Retinopathy in Dogs with Spontaneous Diabetes Mellitus. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 488–495. <https://doi.org/10.1111/jvim.12286>
- Hoenig, M., 2002. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 221–229. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00264-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00264-2)
- Kang, M.-H., Heo, R.-Y., Park, H.-M., 2016. Evaluation of D-Dimer Concentrations in Clinically Ill Dogs with High Risk of Thromboembolic Disease. *Pak Vet J* 5.

- Kitrell, D., Berkwitz, L., 2012. Hypercoagulability in dogs: pathophysiology. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 34, E1-5.
- Kobayashi, T., Kubo, E., Takahashi, Y., Kasahara, T., Yonezawa, H., Akagi, Y., 1998. Retinal vessel changes in galactose-fed dogs. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 116, 785–789.
- Kowluru, R.A., Kowluru, A., Veluthakal, R., Mohammad, G., Syed, I., Santos, J.M., Mishra, M., 2014. TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 57, 1047–1056. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3194-z>
- Kuzi, S., Segev, G., Haruvi, E., Aroch, I., 2010. Plasma Antithrombin Activity as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Dogs: A Retrospective Study of 149 Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 587–596. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0497.x>
- Landry, M.P., Herring, I.P., Panciera, D.L., 2004. Funduscopy findings following cataract extraction by means of phacoemulsification in diabetic dogs: 52 cases (1993-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 709–716.
- Madan, R., Gupta, B., Saluja, S., Kansra, U.C., Tripathi, B.K., Guliani, B.P., 2010. Coagulation profile in diabetes and its association with diabetic microvascular complications. *J. Assoc. Physicians India* 58, 481–484.
- Mattin, M.J., O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C., 2014. An epidemiological study of diabetes mellitus in dogs attending first opinion practice in the UK. *Vet. Microbiol.* 174, 349+.
- Mazzi, A., Fracassi, F., Dondi, F., Gentilini, F., Famigli Bergamini, P., 2008. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet. Res. Commun.* 32 Suppl 1, S299-301. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9133-z>

- Mekki Mohammad O., Jaykumar Rohinivilasam V., Gader Abdel Galil M. Abdel, 1992. Hemostatic Variables in Arab Diabetics. *Ann. Saudi Med.* 12, 345–351. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.1992.345>
- Muñana, K.R., 1995. Long-term complications of diabetes mellitus, Part I: Retinopathy, nephropathy, neuropathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 25, 715–730. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(95\)50064-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(95)50064-6)
- Nakashima, S., 2002. Protein Kinase Ca ($\text{PKC}\alpha$): Regulation and Biological Function. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 669–675.
- Nelson, R.W., Reusch, C.E., 2014. ANIMAL MODELS OF DISEASE: Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J. Endocrinol.* 222, T1–T9. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0202>
- Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Hassan, F.I., Momtaz, S., Abdollahi, M., 2018. Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. *Vet. World* 11, 410–422. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.410-422>
- O A Agapova et. al., n.d. Altered expression of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases in human glaucomatous optic nerve head astrocytes.
- Pechlivani, N., Ajjan, R.A., 2018. Thrombosis and Vascular Inflammation in Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Front. Cardiovasc. Med.* 5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00001>
- Penning, T.M., 2019. AKR1C3 (type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* 489, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.07.002>

- Saraygord-Afshari, N., Naderi-Manesh, H., Naderi, M., 2015. Increasing proteome coverage for gel-based human tear proteome maps: towards a more comprehensive profiling. *Biomed. Chromatogr. BMC* 29, 1056–1067. <https://doi.org/10.1002/bmc.3392>
- Sobczak, A.I.S., Stewart, A.J., 2019. Coagulatory Defects in Type-1 and Type-2 Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6345. <https://doi.org/10.3390/ijms20246345>
- Struble, A.L., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Kass, P.H., 1998. Systemic hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 822–825.
- Tardo, A.M., Del Baldo, F., Dondi, F., Pietra, M., Chiocchetti, R., Fracassi, F., 2019. Survival estimates and outcome predictors in dogs with newly diagnosed diabetes mellitus treated in a veterinary teaching hospital. *Vet. Rec.* 185, 692. <https://doi.org/10.1136/vr.105227>
- Teni, D.A., Enquoselassie, F., Atsmeg, C., 2019. Survival Analysis of Diabetes Mellitus Patients Using Parametric, Non-Parametric and Semi-Parametric Approaches: Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop. E-J. Res. Innov. Foresight Ee-JRIF* 7.
- Zhou, L., Zhao, S.Z., Koh, S.K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., Li, X.R., Beuerman, R.W., 2012. In-depth analysis of the human tear proteome. *J. Proteomics* 75, 3877–3885. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.053>

5. Informacja o istotnej aktywności naukowej albo artystycznej, realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W 2009 roku, jako studentka VI roku, odbyłam 3-miesięczny staż naukowy pod kierunkiem prof. Josefa Illka (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno, Czechy), podczas którego brałam udział w badaniach nad suplementacją beta-karotenu u bydła. Wyniki badań przedstawiono jako doniesienie na Światowej Konferencji Bujatrycznej w Chile: Illek J.,

Kumprechtova D., Kudrna V., Wylupek D., The effect of two different routes of beta carotene supplementation on beta carotene concentrations in blood and reproduction results in dairy cows, XXVI World Buiatrics Congress, 2010, p. 69-70.

W 2010 roku, odbyłam dwumiesięczny staż na Uniwersytecie w Lund w Szwecji. Na szwedzkiej uczelni brałam udział w badaniach eksperymentalnych na świńskich modelach pod kierunkiem prof. Stefana Pierzynowskiego. Badania dotyczyły interakcji pomiędzy niewydolnością wewnątrzwydzielniczą trzustki a zabiegami bariatrycznymi. Wynikiem projektu była wspólna praca: Winiarczyk S., Valverde Piedra J., Szymańczyk S., Szewiec K., Chrościcki A., Mackiewicz J., Winiarczyk M., Wyłupek D., Adaszek Ł., Torres K., Świeboda P., Prykhodko O., Fedkiv O., Majda B., Rafał Filip R., Goncharova K., Pierzynowski S., Is hyperoxaluria in a porcine model of Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) associated with exocrine pancreatic insufficiency? Post. Nauk Med. 2015: 5, 317-324.

W 2011 roku odbyłam trzymiesięczny staż podyplomowy na Uniwersytecie w Turynie. Podczas pobytu zdobyłam doświadczenie kliniczne i naukowe z zakresu nefrologii.

W 2015 roku odbyłam w ramach programu Erasmus staż szkoleniowy mobilności dla pracowników naukowych na Uniwersytecie w Kordobie w Hiszpani. Celem wyjazdu było poszerzenie wiedzy i wymiana doświadczeń na temat chorób wektorowych. Efektem współpracy z ośrodkiem goszczącym była wspólna publikacja: Diaz-cao J., Adaszek Ł., Dzięgiel B., Paniagua J., Caballero-Gomez J., Winiarczyk S., Winiarczyk D., Terriza D., Bocanegra I., Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain. Transbound. Emerg. Dis. 2022 May: 69(3): 1084-1094. DOI: 10.1111/tbed.14065.

W 2019 roku odbyłam tygodniowy staż na Uniwersytecie w Cambridge w Wielkiej Brytanii w Katedrze i Klinice Neurologii i Neurochirurgii, w której miałam szansę zdobyć doświadczenie kliniczne i naukowe. Razem z grupą badaczy pod kierunkiem dr. Paula Freemana opracowany

został wspólny projekt pt. „Canine Intervertebral Disc Disease: How much do we know?”, który w przyszłości z pewnością zaowocuje publikacjami.

Podjęłam również współpracę z Kliniką Chirurgii Siatkówki i Ciała Szklistego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w zakresie badań proteomicznych płynów ustrojowych w przebiegu schorzeń okulistycznych u ludzi i zwierząt. Efektem wieloletniej współpracy są następujące publikacje:

- Winiarczyk M., Biela K., Michalak K., Winiarczyk D., Mackiewicz J., Changes in tear proteomic profile in ocular diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022 Oct 16: 19(20): 13341.
- Winiarczyk M., Kaarniranta K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Winiarczyk D., Mackiewicz J., Tear film proteome in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018 Jun: 256(6): 1127-1139.
- Winiarczyk M., Winiarczyk D., Banach T., Adaszek L., Madany J., Mackiewicz J., Pietras-Ozga D., Winiarczyk S., Dog tear film proteome in-depth analysis. *PLOS ONE*, 2015 Dec 23: 10(12): e0144242.
- Winiarczyk M., Winiarczyk D., Michalak K., Kaarniranta K., Adaszek Ł., Winiarczyk S., Mackiewicz J., Dysregulated Tear Film Proteins in Macular Edema Due to the Neovascular Age-Related Macular Degeneration are Involved in the Regulation of Protein Clearance, Inflammation, and Neovascularization. *J. Clin. Med.*, 2021 Jul 10: 10(14): 3060.
- Winiarczyk D., Winiarczyk M., Balicki I., Szadkowski M., Michalak K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Proteomic Analysis of Tear Film in Canine Diabetic Patients with and without Retinopathy. *J. Vet. Res.* 2022 Nov 7: 66(4): 629-635.
- Winiarczyk D., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Michalak K., Adaszek Ł., Proteomic Analysis of Tear Film Obtained from Diabetic Dogs. *Animals (Basel)*, 2020 Dec 17: 10(12): 2416.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

W ramach mojej działalności popularyzującej naukę brałam czynny udział w Dniach Otwartych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, organizując wykład pt. „Weterynaria we krwi – krew w weterynarii”.

Jestem również autorem i współautorem artykułów popularnonaukowych obejmujących głównie problematykę nefrologii i okulistyki weterynaryjnej, m.in. opracowania wchodzącego w skład monografii Medycyna kotów 2022, „Weterynaria w praktyce”: Z. Brożyna, R. Kulisiewicz, D. Winiarczyk, Kot z nadczynnością tarczycy jako częsty pacjent endokrynologiczny w gabinecie weterynaryjnym. Artykuł został przygotowany wraz ze studentami V roku kierunku weterynaria.

Aktualnie jestem w trakcie redagowania (Guest Editor) wydania specjalnego: „Advances in Veterinary Ocular Pathology” czasopisma Animals.

Od 2020 roku prowadzę nadzór nad ewidencją leków narkotycznych w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Proteomicznego.

Od początku pracy w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych w 2011 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami kierunku weterynaria z przedmiotów: diagnostyka kliniczna (III rok), choroby psów i kotów (V rok), staże kliniczne (VI rok) oraz pediatria z elementami behawioru małych zwierząt (VI rok, przedmiot fakultatywny). Od 2020 roku prowadzę zajęcia na Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, na kierunku pielęgnacja zwierząt i animaloterapia, z przedmiotu fakultatywnego metody dokumentacji weterynaryjnej (I rok) oraz

z przedmiotu obligatoryjnego blok medyczny I (II rok studiów stacjonarnych i niestacjonarnych).

Biorę również udział w realizacji dydaktyki dla studentów anglojęzycznych na kierunku weterynaria, prowadząc wykłady i ćwiczenia z przedmiotu internal diseases of small animals (V rok).

Kilkakrotnie prowadziłam warsztaty dla uczniów Technikum Weterynaryjnego odwiedzających Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie oraz zajęcia laboratoryjne i wykład dla studentów kierunku biotechnologia UMCS w Lublinie w ramach zajęć terenowych.

Poza aktywnością dydaktyczną i naukową, biorę również udział w działalności klinicznej Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych przyjmując pacjentów internistycznych.

7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy

7.1. Nagrody i wyróżnienia

7.1.1. Nagroda „Best Young Investigators” przyznana przez European Association for Vision and Eye Research podczas Kongresu EVER 2020.

7.1.2. Nagroda „Best Contribution” za pracę: „Ten differentially expressed proteins in the tear film of dogs with diabetic retinopathy”, przyznana podczas Europejskiego Kongresu EVER 2021.

7.1.3. Nagroda za najlepsze wystąpienie podczas konferencji naukowej: „Current approach to health and diseases in animals and humans”, Lublin 2019 r.

7.1.4. Nagroda indywidualna III stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za osiągnięcia naukowe w latach 2019-2021.

7.1.5. Wyróżnienie pracy doktorskiej na wniosek recenzentów.

7.2. Szkolenia podnoszące kompetencje zawodowe

7.2.1. Staż podyplomowy: Ospedale per animali da compagnia Anubi, Moncalieri, Włochy, 1-30.08.2011 r.

7.2.2. Szkolenie pt. „Ultrasound Training”, Poznań, 26-30.09.2011 r.

7.2.3. Szkolenie pt. „Ultrasound basics of abdominal cavity, breast and thyroid”, Zamość, 11-16.09.2011 r.

7.2.4. Szkolenie pt. „MALDI-TOF-MS Operator Training Course Proteomics”, Bruker Daltonick, Bremen, 18-21.06.2012 r.

7.2.5. Szkolenie pt. „LC-MALDI coupling”, Bruker Daltonik, Bremen, 21-22.06.2012 r.

7.2.6. Szkolenie pt. „MALDI Supplementary Training Course for MALDI-Imaging”, Bruker Daltonick, Bremen, 25-26.06.2012 r.

7.2.7. Szkolenie z zakresu elektroforezy 2D i proteomiki moczu, Veterinary University in Vienna, Department of Biochemistry, Austria, 10-15.11.2013.

7.2.8. Szkolenie łączone dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych i edukacyjnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 2015 r.

7.2.9. Szkolenie pt. „Efektywna komercjalizacja badań naukowych”, Warszawa, 21.03.2018 r.

7.2.10. European School for Advanced Veterinary Studies, Ophtalmology I, Portugalia, 13-22.03.2023 r.

7.3. Kierowanie projektami badawczymi

7.3.1. „Opracowanie metody przygotowania próbki filmu łzowego psa do analizy profilu białkowego metoda spektrometrii mas MALDI-TOF”. Projekt finansowany w ramach wewnętrznego konkursu w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie ze środków na naukę przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, realizowany w latach 2014-2015.

7.3.2. „Analiza profilu białkowego próbki moczu psa metodą spektrometrii mas MALDI-TOF”. Projekt finansowany w ramach wewnętrznego konkursu w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie ze środków na naukę przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, realizowany w latach 2017-2018.

7.3.3. „Analiza proteomu filmu łzowego u psów z cukrzycą przy użyciu spektrometrii mas”. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 12 (decyzja dyrektora Narodowego Centrum Nauki nr 2016/23/N/NZ5/02576), realizowany w latach 2017-2021.

7.3.4. „Analiza proteomu filmu łzowego u samca i samicy zdrowego psa przy użyciu spektrometrii mas”. Projekt finansowany w ramach wewnętrznego konkursu w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie ze środków na naukę przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, realizowany w latach 2021-2023.

7.4. Recenzje artykułów naukowych

Regularnie recenzuję artykuły naukowe dla czasopism: International Journal of Molecular Sciences, Animals, Biomedicines, Journal of Veterinary Internal Medicine.

7.5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Tematy prowadzonych przeze mnie pozostałych badań naukowych oraz pozostały dorobek publikacyjny obejmuje następujące zagadnienia:

- proteomika filmu łzowego w schorzeniach okulistycznych u ludzi i zwierząt;
- choroby transmisyjne w Polsce i na świecie;
- zmiany proteomiczne moczu w przebiegu uszkodzenia nerek u psów;
- patologie narządu wzroku u psów.

7.5.1. Proteomika filmu łzowego w schorzeniach okulistycznych u ludzi i zwierząt

Skład białkowy filmu łzowego u ludzi i zwierząt jest obecnie analizowany w licznych schorzeniach ogólnych i miejscowych, wykazując bezpośredni związek pomiędzy chorobami oka i zaburzeniami innych narządów a zachodzącymi w nich zmianami. Porównywanie prawidłowego profilu białkowego filmu łzowego z profilem pojawiającym się w przebiegu danej choroby jest metodą prowadzącą do selekcji potencjalnych biomarkerów diagnostycznych.

W celu ustalenia punktu odniesienia do kolejnych badań, skupiliśmy się na opracowaniu pełnego proteomu filmu łzowego zdrowego psa. Próbkę filmu łzowego zostały pobrane od sześciu psów, rozdzielone w żelu elektroforetycznym (1D SDS-PAGE), a następnie uzyskane prążki zostały poddane analizie w spektrometrze mas MALDI-TOF. W rezultacie zidentyfikowano 125 białek, wśród nich: MCA (Major Canine Allergen), Serum albumin, UPF0557 protein C10orf119 homolog, Collagen alpha-2(I) chain, Tyrosine-protein kinase Fer, Keratine type II cytoskeletal, Beta-crystallin B2, Interleukina-6 i Desmina, które wykazały najwyższy współczynnik pewności identyfikacji. Poniższa praca zawiera szczegółowy opis projektu i jest pierwszym w literaturze opracowaniem pełnego proteomu filmu łzowego u zdrowych psów:

- Winiarczyk M., Winiarczyk D., Banach T., Adaszek Ł., Madany J., Mackiewicz J., Pietras-Ożga D., Winiarczyk S., Dog Tear Film Proteome In-Depth analysis. PLOS ONE 2015 Dec 23: 10(12): e0144242.

Dzięki współpracy z Kliniką Chirurgii Siatkówki i Ciała Szklistego UM w Lublinie i grupą prof. Kai Kaarniranta (Uniwersytet Wschodniej Finlandii, Kuopio) podjęliśmy próbę opracowania pierwszej kompletnej charakterystyki filmu łzowego u ludzi ze zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem (AMD), wiodącej przyczynie ślepoty osób powyżej 50. roku życia w krajach rozwiniętych. W wyniku prowadzonych prac zidentyfikowaliśmy białka różnicujące w filmie łzowym pacjentów z AMD. Zdecydowana większość z nich jest ściśle związana z procesami leżącymi u podstaw rozwoju AMD – zapaleniem, neowaskularyzacją, apoptozą i stresem oksydacyjnym. W pierwszej z głównych prac opublikowanych w ramach wspomnianej współpracy zidentyfikowaliśmy 342 białka, w tym 8 charakterystycznych tylko dla obu postaci AMD, zanikowej i wysiękowej: Shootin-1, Histatin-3, Fidgetin-like protein 1, SRC kinase signaling inhibitor, Graves disease carrier protein, Actin cytoplasmic 1, Prolactin-inducible protein 1 i białko S100-A7A. Wszystkie te białka wykazywały wyższą ekspresję w filmie łzowym pacjentów z AMD. Wyniki przedstawione zostały w publikacji:

- Winiarczyk M., Kaarniranta K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Winiarczyk D., Mackiewicz J., Tear film proteome in age-related macular degeneration, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2018 Jun; 256(6): 1127-1139.

W początkowych badaniach nie mieliśmy jeszcze opracowanej metodyki oznaczania poziomu ekspresji danego białka. W kolejnych eksperymentach udało się to uzyskać za pomocą włączenia do analizy odpowiedniego oprogramowania (Delta 2D) i udoskonalenia procesu przygotowania próbek. Dzięki temu przeanalizowaliśmy materiał pochodzący tym razem wyłącznie od pacjentów z wysiękową, aktywną postacią AMD. W rezultacie zidentyfikowaliśmy 11 białek różnicujących, z których 8 wykazywało obniżoną ekspresję (downregulated), a 3 podwyższoną (upregulated). Zidentyfikowaliśmy po raz kolejny białka pełniące kluczowe role w szlakach związanych z procesami zapalenia, stresu oksydacyjnego, neowaskularyzacji i apoptozy. Wyniki zostały przedstawione w artykule:

- Winiarczyk M., Winiarczyk D., Michalak K., Kaarniranta K., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Mackiewicz J., Dysregulated Tear Film Proteins in Macular Edema Due to the Neovascular Age-Related Macular Degeneration Are Involved in the Regulation of Protein Clearance, Inflammation, and Neovascularization. J. Clin. Med. 2021 Jul: 10(14): 3060.

7.5.2. Choroby wektorowe w Polsce i na świecie

Babeszjoza/piroplazmoza jest transmisyjną chorobą ludzi i zwierząt przenoszona przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*. Mikroskopowe badanie rozmazów krwi stanowi stosunkowo szybką metodę diagnozowania babeszjozy, niemniej jednak jego wynik uzależniony jest z jednej strony od intensywności inwazji, z drugiej, od dokładności i doświadczenia osoby oceniającej preparat. Zdarza się bowiem, że przy niskiej, niejednokrotnie okresowej parazytemii bardzo trudno jest wykazać obecność pierwotniaków. Ponadto często nie mają one typowego kształtu, zaś erythrocyty chorych osobników ulegają wakuolizacji, co dodatkowo utrudnia rozpoznanie zarażenia. Z tego też względu istnieje konieczność równoległego użycia w diagnostyce babeszjozy innych technik badawczych. W poniższych publikacjach przedstawiliśmy zastosowanie techniki spektrometrii mas MALDI-TOF, techniki LAMP w rozpoznawaniu babeszjozy u psów:

- Adaszek Ł., Banach T., Bartnicki M., Winiarczyk D., Łyp P., Winiarczyk S., Application the mass spectrometry MALDI-TOF technique for the detection of *Babesia canis canis* infection in dogs. Parasitol. Res. 2014: 113, 11, 4293-4295.
- Adaszek Ł., Jankowska M., Kalinowski M., Banach T., Wyłupek D., Winiarczyk S., The loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Babesia canis canis* infections in dogs. Pol. J. Vet. Sci. 2013: 16, 1, 131-133.
- Adaszek Ł., Jankowska M., Wyłupek D., Winiarczyk S., Przydatność techniki LAMP w szybkim rozpoznawaniu babeszjozy u zwierząt. Med. Wet. 2013: 69, 3, 145-149

Celem kolejnych badań była ocena występowania *Anaplasmy phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* i *Babesi canis* u dorosłych męskich i żeńskich postaci kleszczy pospolitych *Ixodes ricinus* i kleszczy łąkowych *Dermacentor reticulatus*, bytujących na łąkach w pobliżu terenów leśnych w województwie lubelskim (wschodni region Polski). Kleszcze zostały zebrane metodą flagowania w sezonie aktywnym (pomiędzy marcem a październikiem 2012 roku). Spośród wszystkich 720 zebranych sztuk, 506 stanowił *Dermacentor reticulatus*, a 214 *Ixodes ricinus*. DNA *Babesia canis* zidentyfikowano u 21,3%, a *Borrelia burgdorferi* u 0,6% kleszczy łąkowych. W przypadku populacji kleszczy pospolitych, DNA specyficzne dla *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* wykryto odpowiednio w 5,6% i 10,3%. Opisane w poniższej publikacji wyniki wskazują, że teren wschodniej Polski jest regionem podwyższonego ryzyka występowania chorób u ludzi i zwierząt przenoszonych przez kleszcze:

- Dziegiel B., Kubrak T., Adaszek Ł., Dębiak P., Wyłupek D., Bogucka-Kocka A., Lechowski J., Winiarczyk S., Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). Bull. Vet. Inst. Pulawy 2014: 58, 29-33.

Dzikie zwierzęta kopytne mogą być rezerwuarem dla niektórych patogenów przenoszonych przez kleszcze, a tym samym stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Celem naszych badań było poszerzenie wiedzy dotyczącej występowania *Anaplasma phagocytophilum* (AP) w dużej populacji saren w regionie wschodniej Polski. W tym celu pobrano próbki śledziony pochodzące od 424 saren w okresie sezonu łownego między 2018 a 2019 rokiem. Genetyczne badanie przesiewowe dla AP wykonane metodą PCR wykazało, że 26 spośród 424 próbek śledziony (6,13%) było pozytywnych. Pomimo niskiego odsetka występowania AP u saren w badanym regionie Polski, nadal pozostają one rezerwuarem dla kleszczy. Ze względu na zoonotyczne zagrożenie anaplazmozą granulocytarną wskazany jest ciągły monitoring tej choroby wśród domowych i dzikich farm zwierząt. Wyniki przedstawiono w publikacji:

- Teodorowski O., Radzki R., Kalinowski M., Winiarczyk M., Bocanegra I., Winiarczyk D., Adaszek Ł., Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in eastern Poland. Ann. AgricEnviron. Med. 2020: 27(4): 702-705.

Podobne badania powtórzone zostały dzięki współpracy z Uniwersytetem w Kordobie w Hiszpani. Celem pracy była ocena występowania wybranych patogenów przenoszonych przez kleszcze u dzikich zwierząt kopytnych w ekosystemie śródziemnomorskim w południowej części Hiszpani. W tych badaniach procedura pobierania próbek była taka sama jak w poprzednim badaniu. Próbki śledziona zostały pobrane od 1132 dzikich kopytnych zwierząt, w tym: 578 jeleni szlachetnych, 269 dzików, 135 muflonów, 121 danieli i 29 saren w okresie od 2009 do 2015 roku. 89 kleszczy pobrano i poddano analizie. Pochodziły one tylko od zwierząt, u których pozytywnie zidentyfikowano patogeny wektorowe. Materiał analizowano metodą PCR. DNA patogenów przenoszonych przez kleszcze zostało zidentyfikowane u 127 spośród 863 dzikich przeżuwaczy: *Anaplasma phagocytophilum* u 9,2%, *Babesia divergens* u 2,9%, *Theileria* sp. OT3 u 1,7%, *Borrelia afzelii* u 0,7% i *Theileria capreoli* u 0,2%. Natomiast w żadnej próbce pochodzącej od dzików nie zanotowano DNA patogenów. Czynniki ryzyka analizy wykazały, że występowanie *A. phagocytophilum* i *piroplasmata* było powiązane gatunkowo. Dokładna analiza została przedstawiona w poniższym artykule:

- Diaz-Cao J., Adaszek Ł., Dzięgiel B., Paniagua J., Caballero-Gomez J., Winiarczyk S., Winiarczyk D., Cano-Terriza D., Bocanegra I., Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain. Transbound. Emerg. Dis. 2022: 69(3): 1084-1094.

W kolejnej pracy opisaliśmy przypadek kliniczny anaplazmozy granulocytarnej u lemura (*Lemur catta*) bytującego w Polsce. 4-letnia samica lemura wykazywała objawy w postaci anoreksji, krwawienia z nosa i obecności licznych kleszczy. Badaniem mikroskopowym rozmazu krwi stwierdzono obecność moruli w neutrofilach. Wykonano badanie PCR, które

potwierdziło infekcję *Anaplasma phagocytophilum* odmianą GU183908. Po włączeniu postępowania terapeutycznego doksycykliną (2,5 mg/kg p.o.) przez 3 dni, zaobserwowano powrót do zdrowia. Praca stanowi pierwsze doniesienie na temat występowania anaplazmozy granulocytarnej u lemura w Europie. Zarażenie *A. phagocytophilum* powinno być brane pod uwagę w diagnostyce różnicowej, szczególnie w przypadkach trombocytopenii.

- Adaszek Ł., Wilczyńska A., Ziętek J., Kalinowski M., Teodorowski O., Winiarczyk D., Skrzypczak M., Winiarczyk M., Granulocytic anaplasmosis in captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*) in Poland. BMC Vet. Res. 2021: 17(1): 118.

Kolejne badania dotyczyły molekularnej analizy chorób przenoszonych przez kleszcze: piroplazmozy, anaplazmozy granulocytarnej i boreliozy, w populacji koni w Polsce od koni wykazujących objawy wyżej wymienionych infekcji. Obecność materiału genetycznego *Theileria equi* stwierdzono w 37 z 512 przebadanych koni (7,2%), a *Anaplasma phagocytophilum* w 9 przypadkach (1,8%). DNA *Borrelia burgdorferi* było obecne u 11 z 204 przebadanych koni (5,4%). Przedstawione wyniki wskazują, że choroby wektorowe występujące u koni w Polsce nie stanowią tak dużego problemu w porównaniu z resztą Europy. Niemniej jednak należy mieć na uwadze wspomniane choroby w diagnostyce różnicowej podczas diagnozowania pacjentów z objawami letargu, gorączki, anemii i trombocytopenii.

- Teodorowski O., Kalinowski M., Winiarczyk D., Janecki R., Winiarczyk S., Adaszek Ł., Molecular surveillance of tick-borne diseases affecting horses in Poland – own observation. Vet. Med. Sci 2021: 7(4): 1159-1165.

W poniższej publikacji przeglądowej zestawiliśmy aktualny stan wiedzy dotyczący sytuacji epidemiologicznej powodowanej przez *Babesia gibsoni* u psów w Europie. W większości krajów Europy, gdzie *Babesia gibsoni* została zanotowana, procentowo odpowiada ona za zainfekowanie około 1% psów. Największą częstotliwość występowania choroby zaobserwowano u American Bull Terriers, co sugeruje predyspozycję u tej rasy psów.

- Teodorowski O., Kalinowski M., Winiarczyk M., Dokuzeylul B., Winiarczyk S., Adaszek Ł., *Babesia gibsoni* Infection in Dogs – A European Perspective. *Animals* 2020; 12(6): 730.

7.5.3. Zmiany proteomiczne moczu w przebiegu uszkodzenia nerek u psów

Choroby nerek u psów, obok niewydolności krążenia, są najczęstszą przyczyną zejść śmiertelnych. Mimo wielu znanych aspektów ich przebiegu, sposobów rozpoznawania i leczenia, pozostają one nadal kluczowym powodem obniżania jakości i skracania życia wielu psów. Możliwość zastosowania nowego narzędzia w diagnozowaniu chorób nerek – proteomiki budzi duże nadzieje w nefrologii weterynaryjnej. Proteomika jest metodą określania jakościowego oraz ilościowego składu peptydowo-białkowego, czyli peptydomu/proteomu w określonym materiale biologicznym, np. w moczu, w danej sytuacji klinicznej. Określenie zmian jakościowych i/lub ilościowych w obrębie peptydomu lub proteomu pozwala scharakteryzować zestawy biomarkerów typowych dla konkretnych sytuacji. Mocz jest materiałem uzyskiwanym nieinwazyjnie, w dużej ilości, jego pobieranie można powtarzać.

Celem moich badań było:

1. Utworzenie odpowiedniej metodyki przygotowania próbki moczu do analizy proteomicznej.
2. Lokalizacja uszkodzenia nefronu w przebiegu nefropatii uwarunkowanej genetycznie, na tle babeszjozy i przewlekłej choroby nerek u psów.
3. Charakterystyka profili białkowych moczu w wymienionych nefropatiach.
4. Poszukiwanie potencjalnych markerów białkowych uszkodzenia nerek ułatwiających rozpoznawanie pierwotnych chorób odpowiedzialnych za występujące nefropatie.

Wszystkie cele zostały zrealizowane, a pełne opracowania zamieszczone w poniższych publikacjach:

- Banach T., Adaszek Ł., Wyłupek D., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Applicability of 2D gel electrophoresis and liquid chromatography in proteomic analysis of urine using mass spectrometry MALDI-TOF. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013: 3: 587-592.
- Winiarczyk D., Adaszek Ł., Bartnicki M., Abramowicz B., Łyp P., Madany J., Winiarczyk S., Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction in canine babesiosis. *Tierarz. Prax.* 2017: 45 (2): 84-88.
- Winiarczyk D., Michalak K., Adaszek Ł., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Urinary proteome of dogs with kidney injury during babesiosis. *BMC Vet. Res.* 2019: 15, 439: 1-9.
- Winiarczyk D., Adaszek Ł., Madany J., Winiarczyk M., Winiarczyk S., Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction in familial glomerulonephritis in Doberman dogs. *J. Vet. Res.* 2020: 64 (1): 181-186.
- Winiarczyk D., Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction I dogs with chronic kidney disease. *Med. Wet.* 2020: 76 (9): 525-528.

7.5.4. Patologie narządu wzroku u psów

Okulistyka weterynaryjna jest wąską dziedziną medycyny weterynaryjnej, intensywnie rozwijającą się. Niezmienny jest natomiast plan badania klinicznego narządu wzroku. Prawidłowa procedura postępowania w przypadku diagnozowania schorzeń okulistycznych, w tym właściwe wykorzystanie sprzętu okulistycznego i odpowiednia interpretacja zaobserwowanych nieprawidłowości, pozwala klinicyście postawić trafną diagnozę.

W poniższych opracowaniach popularnonaukowych przedstawiłam: plan badania klinicznego pacjentów okulistycznych, najczęściej wykorzystywane testy diagnostyczne w różnicowaniu przyczyn zaburzeń dotyczących filmu łzowego oraz najczęstsze choroby powiek u psów.

- Winiarczyk D., Etapy badania klinicznego narządu wzroku u małych zwierząt. *Weterynaria w praktyce* 2021: 18 (4): 65-70.

- Winiarczyk D., Diagnostyka zaburzeń dotyczących filmu łzowego u psów. *Weterynaria w praktyce* 2021: 18 (10): 93-97.
- Wybrane choroby powiek u małych zwierząt. Winiarczyk D. *Weterynaria w praktyce* 2022: 19 (1-2): 37-44.

W badaniach własnych dokonaliśmy porównania dwóch metod pomiaru ciśnienia gałkowego u psów: przy użyciu tonometru Tono-Pen Vet oraz metodą Schiotza. Badanie wykonano u 31 klinicznie zdrowych psów (62 oczach), różnych ras oraz różnej płci. Uzyskano następujące wyniki: IOP mierzone za pomocą tonometru Schiotza wynosił 12-24 mm Hg (średnio 16.3 ± 2.1), natomiast pomiar dokonany tonometrem TonoPen Vet 11-25 mm Hg (średnio $18,1 \pm 3,8$). Średnie wyniki pomiaru dwiema metodami różniły się statystycznie. Natomiast ze względu na niewielką różnicę w wynikach, można uznać, że obie metody mogą być stosowane do badania klinicznego. Dokładny opis badania zamieszczono w artykule:

- Wrześniewska K., Madany J., Winiarczyk D., Comparison of Intraocular Pressure Measurement with Schiotz Tonometer and Tono-Pen Vet tonometer in Healthy Dogs. *J. Vet. Res.* 2018: 62 (2): 243-247.

W moim dorobku naukowym znajduje się również 10 doniesień konferencyjnych, z których 4 zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report. Szczegółowe dane na ich temat jak również informacje o wygłoszonych referatach na konferencjach krajowych i międzynarodowych znajdują się w Załączniku 4 (Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny) do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria.

Lublin, 20.09.2023 r.

.....

(podpis wnioskodawcy)