

Załącznik 2A
do wniosku z dnia 07.01.2019 r.
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

Dr inż. JOANNA ZUBEL-ŁOJEK

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków 2019

1. IMIĘ I NAZWISKO

Joanna Zubel-Łojek (z domu Zubel)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Magister inż. zootechniki, tytuł uzyskany 16 czerwca 2000r. na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Krakowie, praca magisterska pt. *Wpływ dexametazonu i naltreksonu na wydzielanie in vitro met-enkefaliny z podwzgórza, przysadki i nadnerczy owiec.*

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec,

Recenzent: Prof. dr hab. Włodzimierz Popek (Akademia Rolnicza w Krakowie)

Doktor nauk rolniczych, stopień uzyskany 25 lutego 2004r. na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Krakowie, rozprawa doktorska pt. *Rola opioidów w immunosupresyjnym oddziaływaniu glikokortykoidów u owiec.*

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec,

Recenzenci: Prof. dr hab. Wiesław Skrzypczak (Akademia Rolnicza w Szczecinie), dr hab. Krzysztof Nowak, Prof. AR (Akademia Rolnicza w Poznaniu)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

12.2000 – 08.2002 **asystent naukowo-dydaktyczny**; Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (wymiar 0,5 etatu).

10.2004 – 10.2006 **asystent naukowo-dydaktyczny**; Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

11.2006 – obecnie **adiunkt naukowo-dydaktyczny**; Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W Dz. U. z 2016 R. POZ. 1311.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Immunomodulacyjna rola trzewnej tkanki tłuszczowej w stanie zapalnym u zwierząt

4.2. AUTORZY, TYTUŁ PUBLIKACJI, NAZWA WYDAWNICTWA, ROK WYDANIA,

Joanna Zubel-Łojek. Immunomodulacyjna rola trzewnej tkanki tłuszczowej w stanie zapalnym u zwierząt. Wydawnictwo UR w Krakowie, 2018, Rozprawa habilitacyjna

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

Podstawę rozprawy habilitacyjnej pt „Immunomodulacyjna rola trzewnej tkanki tłuszczowej w stanie zapalnym u zwierząt” stanowią wyniki uzyskane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN (nr projektu: NN 311 227 138) którego byłam kierownikiem, wzbogacające i uzupełniające aktualny stan wiedzy na temat udziału trzewnej tkanki tłuszczowej w stanie zapalnym u zwierząt.

Tkanka tłuszczowa jest heterogenna zarówno pod względem budowy, jak i pełnionych funkcji, a jej skład komórkowy i morfologia zależą od aktualnego stanu fizjologicznego organizmu. Poza adipocytami w obrębie tkanki tłuszczowej znajdują się: zrąb łącznotkankowy składający się z komórek i substancji pozakomórkowej, komórki nerwowe, bogata sieć naczyń krwionośnych oraz komórki układu odpornościowego [Kershaw i Flier, 2004]. Tkanka tłuszczowa zawiera liczne komórki immunologiczne, takie jak: limfocyty T CD4+ [Winer i in. 2009] i CD8+ [Nishimura i in. 2009], limfocyty T-regulatorowe [Feuerer i in. 2009], limfocyty B [Winer i in. 2011] oraz makrofagi [Wentworth i in. 2010], które mogą być zaangażowane w rozwój otyłości.

Wykazano, iż trzewna tkanka tłuszczowa jest miejscem działania zarówno naturalnych, jak i syntetycznych glikokortykoidów, które mogą regulować proliferację i różnicowanie adipocytów [Joyner i in. 2000]. Warto podkreślić, że długotrwały wzrost stężenia endogennych glikokortykoidów może prowadzić do zespołu metabolicznego, który obejmuje blisko związane ze sobą zaburzenia metaboliczne, takie jak otyłość, hiperglikemia, dyslipidemia, nadciśnienie czy oporność na insulinę. Dlatego powstała hipoteza, mówiąca, że przyczyną tych chorób i zaburzeń, oprócz niebilansowanej diety i nieodpowiedniego trybu życia, może być długotrwale utrzymujące się podwyższone stężenie glikokortykoidów będące odzwierciedleniem stanu stresowego organizmu, czyli zwiększonej aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA), [Rhen i Cidlowsky 2005].

Tkanka tłuszczowa jest wysoce aktywnym narządem metabolicznym i endokrynnym. Obecnie uznaje się, że wytwarza ona wiele bioaktywnych peptydów, zwanych adipokinami, które działają w

obrębie tkanki tłuszczowej (auto- i parakrynnie) oraz na odległe narządy i tkanki (endokrynnie), kształtując przebieg wielu procesów fizjologicznych: pobieranie pokarmu, regulację gospodarki węglowodanowej oraz odporność [Fasshauer i Paschke 2003, Canello i in. 2004, Trayhurn i Wood 2004]. Liczne adipokiny wytwarzane w tkance tłuszczowej mają udział w odpowiedzi immunologicznej i wpływają również na stan zapalny. Endokrynną rolą białej tkanki tłuszczowej oraz udział adipokin w ważnych procesach fizjologicznych sugerują, że zarówno nadmiar, jak i niedobór tkanki tłuszczowej mogą się przyczyniać do zaburzeń procesów metabolicznych.

Otyłość ma silne predyspozycje genetyczne i wynika z nadmiernego spożycia energii i/lub zbyt małego wydatku energetycznego. Jest związana z wyraźnymi zmianami w funkcji wydzielniczej adipocytów i makrofagów, z przewlekłym zapaleniem o niskim nasileniu i zwiększonym ryzykiem rozwoju insulinooporności, cukrzycy i/lub choroby naczyniowej. Nadmiar tkanki tłuszczowej staje się zatem czynnikiem wyzwalającym reakcję zapalną, będącą najprawdopodobniej efektem endo- i parakrynnych oddziaływań związków syntetyzowanych przez adipocyty. Aktywność immunologiczną wykazują między innymi takie czynniki tkanki tłuszczowej, jak cytokiny: TNF- α , IL-6 oraz adipokiny: adiponektyna, rezystyna czy wisfatyna [Matsuzawa 2006]. Rola mediatorów zapalenia w rozwoju otyłości związana jest z przewlekłą aktywacją układu odpornościowego oraz interakcji z układem nerwowym i hormonalnym. Wyniki coraz większej liczby badań wskazują, że istotną rolę w patogenezie otyłości i innych chorób metabolicznych m.in. nietolerancji glukozy, insulinooporności, dyslipidemii czy cukrzycy typu 2, może odgrywać proces zapalny [Hotamisligil 2006, Nishimura i in. 2008, Lê i in. 2011]. Wykazano, iż rozwój schorzeń metabolicznych koreluje z podwyższonym poziomem markerów zapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu α (TNF – α), białko C-reaktywne (CRP), haptoglobina, interleukina 1 β (IL-1 β) czy interleukina 6 (IL-6), [Caselli 2014].

Dlatego, uzasadnionym wydało się podjęcie badań nad interakcją układu odpornościowego i adipokin podczas zaburzeń lipidowo-węglowodanowych u zwierząt. Dotychczasowe badania skupiały się nad analizą wydzielanych adipokin u osobników, u których otyłość wytwarzała się w długim przedziale czasowym. Brakuje natomiast informacji o procesach patofizjologicznych związanych z szybkim odkładaniem się zbyt dużej ilości tkanki tłuszczowej (krótkotrwałe spożywanie wysokokalorycznego pokarmu). Badania prowadzone na różnych modelach doświadczalnych (zwierzęcych, liniach komórkowych) dążą do poznania mechanizmu i udziału adipokin w patogenezie zespołu metabolicznego, ale pomimo rosnącej liczby danych dotyczących roli adipokin nadal istnieje wiele wątpliwości dotyczących ich działania w przebiegu licznych schorzeń. W literaturze naukowej z ostatnich lat opisywane są wyniki eksperymentów prowadzonych na różnych modelach doświadczalnych, głównie gryzoniach – myszach i szczurach. Jednak, należy zwrócić uwagę na to, iż modele są tak dobrane, aby można było oceniać zmiany metabolizmu wywołane otyłością, czyli

stanem utrwalonego zaburzenia homeostazy, natomiast ocena zmian zachodzących w organizmie podczas powstawania/tworzenia nadwagi jest bardzo trudna, lub czasem niemożliwa, przy zastosowaniu pomiaru klasycznych parametrów stanu metabolicznego. Z fizjologicznego, a także medycznego punktu widzenia zauważenie objawów zmian metabolicznych właśnie w tym okresie mogłoby zapobiec stanom zapalnym i otyłości.

Dlatego też celem podjętych badań było poznanie i charakterystyka przebiegu reakcji zapalnej w warunkach zaburzonego metabolizmu, ze szczególnym uwzględnieniem roli tkanki tłuszczowej oraz ocena przydatności wybranych adipokin jako markerów prognostycznych/diagnostycznych stanu zapalnego, szczególnie we wczesnym etapie jego rozwoju.

Dostępna obecnie wiedza o regulacji procesów zachodzących w ustroju opiera się na wynikach doświadczeń prowadzonych na konkretnym modelu badawczym. Najczęściej stosowanym modelem badawczym ze względów ekonomicznych i łatwości hodowli są gryzonie, szczury (*Rattus norvegicus*) i myszy (*Mus musculus*), jednak pomimo, iż nie różnią się aż tak bardzo genetycznie od człowieka, mają zupełnie inną fizjologię, sposób odżywiania i metabolizm, stąd też wykorzystanie wyników badań uzyskanych na tych modelach w medycynie ludzkiej nie zawsze jest możliwe. W badaniach fizjologicznych i żywieniowych ważną rolę odgrywa świnia domowa (*Sus scrofa domestica*), której układ pokarmowy przystosowany do trawienia zarówno pokarmu roślinnego, jak i zwierzęcego. Świnie charakteryzują się zbliżoną do człowieka anatomią oraz systemem immunologicznym, co przemawia za nimi jako dobrymi zwierzętami modelowymi. Do celów badawczych używa się świń gospodarskich różnych ras oraz zwierząt hybrydowych i miniaturowych. W badaniach przedstawionych do osiągnięcia habilitacyjnego szczególną uwagę poświęcono dwóm modelom zwierzęcym: świni domowej (Polska Biała Zwistoucha, PBZ) oraz myszy (szczepu Swiss).

Świnia domowa ze względu na podobieństwo fizjologiczne do człowieka wydaje się szczególnie interesującym zwierzęciem modelowym, niestety ze względów ekonomicznych dość rzadko wykorzystywanym w badaniach. Z kolei wyniki doświadczeń prowadzonych na myszach, gryzoniach powszechnie stosowanych w badaniach fizjologicznych, pozwalają na ich porównanie z wynikami publikowanymi przez inne ośrodki naukowe. Należy także zwrócić uwagę na to, że prowadzenie badań na dwóch różnych modelach zwierzęcych oraz porównanie uzyskanych wyników może przyczynić się do weryfikacji niektórych dotychczasowych hipotez dotyczących roli tkanki tłuszczowej w procesach zapalnych. Analiza wyników badań biomedycznych z zastosowaniem zwierząt laboratoryjnych wskazuje, że obarczone są one licznymi ograniczeniami nakazującymi ostrożność w przenoszeniu wyników tych prac do medycyny ludzkiej. Stąd też, wybranie do badań dwóch gatunków zwierząt pozwoli również na ocenę przydatności otrzymanych wyników i możliwości

ich ekstrapolacji ze zwierząt laboratoryjnych (myszy) na zwierzęta gospodarskie (świnia), a w następnym etapie na człowieka.

Planując badania **postawiono hipotezę badawczą, iż zaburzenia aktywności tkanki tłuszczowej u osobników młodych, niewykazujących negatywnych skutków otyłości, przyczyniają się do wytworzenia przewlekłego stanu zapalnego.** Aby zrealizować założony cel i zweryfikować hipotezę badawczą, doświadczenia wykonano w trzech etapach. W **etapie I** określano immunoendokrynną aktywność trzewnej tkanki tłuszczowej podczas stanu zapalnego (badania *in vivo*). W tym etapie oceniono stan metaboliczny, poziom stresu oraz stan zapalny u zwierząt. Określono zmiany stężenia i sekrecji adipokin zapalnych w trzewnej tkance tłuszczowej oraz zmiany ekspresji genów i receptorów adipokin tkanki tłuszczowej w odpowiedzi na reakcję zapalną w organizmie. W **II etapie** badań określano udział wybranych adipokin (rezystyny, wisfatyny i adiponektyny) w modulowaniu aktywności układu immunologicznego (badania *in vitro*). Oceniono skutki bezpośredniego działania peptydów tkanki tłuszczowej na aktywność proliferacyjną leukocytów oraz zbadano wpływ adipokin pro- i antyzapalnych na proliferację komórek wybranych narządów obwodowych (śledziony i wątroby). W **III etapie** badań oceniano zaangażowanie hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej w immunoendokrynną aktywność adipocytów (badania *in vitro*) określając wpływ hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA) na zmiany sekrecji oraz ekspresji genów adipokin podczas stanu zapalnego.

Badania *in vivo* przeprowadzono na dwóch gatunkach zwierząt (samice): myszach (szczep Swiss, w wieku 6 tygodni) oraz prosiętach (rasa Polska Biała Zwistoucha, w wieku 10 tygodni). Zwierzęta obydwu gatunków utrzymywane były w warunkach standardowych ze stałym dostępem do wody i paszy. Po 7 dniach adaptacji wszystkie zwierzęta zważono, a następnie losowo, podzielono na dwie grupy (n = 12). Chroniczny stan zapalny indukowano zmodyfikowaną dietą prowadzącą do wytworzenia nadwagi w organizmie, natomiast ostry stan zapalny został wywołany poprzez jednorazową iniekcję streptozotocyny. Ponadto, badano odpowiedź tkanki tłuszczowej na jednoczesną indukcję zarówno chronicznego, jak i ostrego stanu zapalnego. Przez okres 14 dni jedna grupa żywiona była paszą standardową (zwierzęta kontrolne), podczas gdy druga grupa, w celu indukcji nadwagi żywiona była paszą wysokoenergetyczną. Po 2 tygodniach zwierzęta zważono, a każdą z grup podzielono losowo na dwie podgrupy (n = 6). W 15. dobie doświadczenia jedna grupa otrzymała jednorazową, dootrzewnową iniekcję soli fizjologicznej (0,9% NaCl), druga grupa otrzymała jednorazową, dootrzewnową iniekcję streptozotocyny. Streptozotocyna (STZ) jest naturalnym antybiotykiem o działaniu cytotoksycznym pozyskiwanym ze szczepu bakterii *Streptomyces griseus*. Podawana kilkakrotnie, w różnych dawkach przez dłuższy czas wykorzystywana jest do eksperymentalnej indukcji cukrzycy u zwierząt [Furman 2015]. Zastosowanie w niniejszych badaniach

jednorazowej iniekcji miało na celu indukcję ostrego stanu zapalnego w początkowej fazie rozwoju choroby (cukrzyca).

W 24. godzinie po iniekcjach od wszystkich zwierząt doświadczalnych pobrano krew, fragmenty trzewnej tkanki tłuszczowej, śledziony oraz wątroby. W **I etapie** niniejszych badań podjęto próbę określenia aktywności trzewnej tkanki tłuszczowej u myszy i prosiąt podczas stanu zapalnego o różnym nasileniu. Do oznaczeń wybranych parametrów w osoczu krwi zwierząt wykorzystano zestawy enzymatyczne (glukoza, triacyloglicerole, cholesterol), radioimmunologiczne (insulina, glukagon, kortykosteron, kortyzol, adrenalina, noradrenalina) oraz immunoenzymatyczne (rezystyna, wisfatyna, adiponektyna, CRP, IL-6, TNF- α). Przeprowadzono analizę stężenia adipokin w homogenatach tkanek (rezystyna, adiponektyna, IL-6, TNF- α , NFkB) oraz w medium inkubacyjnym w celu określenia stopnia wydzielania (rezystyna, IL-6). Oznaczono profil ekspresji genów i receptorów wybranych adipokin metodą RT-PCR. Wyniki wcześniejszych badań wskazują, że fizjologiczna równowaga pomiędzy syntezą pro- i antyzapalnych czynników ulega szybkiemu i często niezauważalnemu zachwianiu, które zwykle przechodzi w chroniczny, ogólnoustrojowy stan zapalny [Monteiro i Azevedo 2010]. Wyniki uzyskane w I etapie niniejszych badań wskazują na potrzebę poszukiwania innych parametrów zaburzeń metabolicznych, umożliwiających ocenę stopnia rozwoju stanu zapalnego i jednocześnie potwierdziły założoną na wstępie hipotezę badawczą, że początek rozwoju otyłości u młodych organizmów, które nie wykazują jeszcze negatywnych skutków nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej (brak widocznych zmian w standardowo mierzonych parametrach metabolicznych) może się już przyczyniać do wytworzenia stanu zapalnego w organizmie. Analizując wyniki otrzymane w tej części badań, należy wyraźnie wskazać, że rodzaj rozwijającego się w organizmie stanu zapalnego daje zróżnicowaną odpowiedź zarówno ze strony krążących we krwi cytokin i adipokin, jak i różne zmiany w obszarze samej tkanki tłuszczowej. Największe zmiany widoczne były u zwierząt z jednoczesną indukcją obydwu stanów zapalnych, co nakazuje zwiększenie obserwacji u osobników z nadwagą w momencie pojawienia się dodatkowych czynników zapalnych. Należy podkreślić że, uzyskane wyniki różniły się w zależności od użytego do badań modelu zwierzęcego. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia późniejszej ich interpretacji i próby przenoszenia tych wyników z myszy i prosiąt na mechanizmy działające u człowieka. Otrzymane wyniki potwierdzają słuszność wyboru do badań dwóch różnych modeli zwierzęcych, a wykazane różnice sugerują, iż w przyszłości należałoby szczególnie rozważyć wyniki otrzymywane na gryzoniach. Ostatnio wykazano, że spadek masy ciała doprowadził do poprawy tolerancji glukozy, ale nie wpłynął na stan zapalny tkanki tłuszczowej zarówno u myszy, jak i u ludzi, co sugeruje wytworzenie się trwałej pamięci prowadzącej do chronicznego stanu zapalnego w obrębie adipocytów związany z ciągłą infiltracją makrofagów [Schmitz i in. 2016]. Dlatego też tak

ważne są badania w początkowym etapie rozwoju otyłości, które mogłyby uchwycić zmiany w tkance tłuszczowej, zanim dojdzie do utrwalenia tej specyficznej pamięci o stanie zapalnym.

W **II etapie** niniejszych badań zbadano udział adipokin w modulowaniu funkcjonowania układu immunologicznego. Hodowlę leukocytów przeprowadzono z pełnej krwi obwodowej pobranej z żyły szyjnej zewnętrznej, zarówno od prosiąt kontrolnych, jak i doświadczalnych. Niewielka objętość osocza krwi myszy nie pozwoliła na przeprowadzenie takiej hodowli. Wykazano, że adipokiny (rezystyna, wisfatyna, adiponektyna) w warunkach *in vitro*, działają bezpośrednio na komórki immunologiczne i zmieniają stopień sekrecji cytokin prozapalnych z leukocytów pobranych od wszystkich prosiąt doświadczalnych. Zaobserwowano wyraźny wzrost wydzielania cytokin prozapalnych po działaniu adipokin, a odpowiedź miała różny stopień nasilenia w zależności od wcześniejszego pobudzenia układu immunologicznego w warunkach *in vivo*. W przeprowadzonych badaniach podjęto również próbę określenia wpływu rezystyny, wisfatyny i adiponektyny na proliferację komórek wątroby i śledziony. Zaobserwowano zmiany podstawowej proliferacji komórek wątroby i śledziony zarówno u myszy, jak i prosiąt doświadczalnych. Wykazano, że kierunek zmian w podstawowej proliferacji tych narządów zależał od rodzaju tkanki, przebiegu stanu zapalnego i modelu doświadczalnego (co ciekawe był całkowicie odmienny u myszy i prosiąt). Dodatkowo, u prosiąt prześledzono wpływ *in vitro* adipokin (rezystyny, wisfatyny i adiponektyny) na proliferację komórek śledziony i wątroby. Wykazano, iż adipokiny zmieniają proliferację w różny sposób zależny od rodzaju tkanki i rozwoju stanu zapalnego. Otrzymane wyniki wyraźnie pokazują, że adipokiny wydzielane z tkanki tłuszczowej zmieniają działanie innych narządów, wpływając w ten sposób na ogólnoustrojowe mechanizmy adaptacji do czynników stresotwórczych. Otrzymane wyniki wskazują na różnice/odrębność/odmienność funkcjonowania zwierząt wybranych do niniejszych doświadczeń.

Przewlekły stres, w połączeniu z dodatnim bilansem energetycznym, może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju otyłości, a w procesie tym mogą uczestniczyć hormony osi HPA. Otyłość i zespół metaboliczny wiążą się ze zmianami w osi HPA, w tym ze zmianami w syntezie kortyzolu w nadnerczach i jego obwodowym metabolizmem. Dlatego też w **III etapie** niniejszych badań postanowiono prześledzić zmiany w aktywności wybranych adipokin pod wpływem bezpośredniego działania na adipocyty CRH, ACTH i deksametazonu (syntetycznego glikokortykoidu) w warunkach fizjologicznych lub w stanie zapalnym (dodatek TNF- α). W tej części eksperymentu badania przeprowadzono na ludzkiej linii komórkowej adipocytów. Określano bezpośredni wpływ hormonów osi HPA na stopień sekrecji oraz ekspresję rezystyny, wisfatyny i adiponektyny w adipocytach. Wyniki uzyskane w III etapie potwierdziły istotny udział hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej w fizjologii tkanki tłuszczowej, zależny od obecności czynnika zapalnego. Jednocześnie rosnące zainteresowanie dwukierunkową interakcją między hormonami nadnerczowymi a peptydami

tkanki tłuszczowej skłania do sformułowania tezy o istnieniu specyficznej osi adipo-nadnerczowej kontrolującej homeostazę organizmu dążącego do osiągnięcia metabolicznej allostazy.

Podsumowując, otrzymane w niniejszym doświadczeniu wyniki, zawarte w rozprawie habilitacyjnej, wyraźnie podkreślają, że wzrost prozapalnej aktywności trzewnej tkanki tłuszczowej rozwija się znacznie wcześniej niż widoczne zaburzenia metaboliczne. Obserwacje te, są niezwykle istotne w świetle danych o zwiększającej się liczbie przypadków otyłości wśród dzieci. Dlatego też badanie rozwoju otyłości na wczesnym jej etapie u młodych organizmów może mieć kluczowe znaczenie w tworzeniu ukierunkowanych terapii, mających na celu zapobieganie otyłości i zespołowi metabolicznemu w przyszłości. Należy również szczególną uwagę poświęcić odpowiedniemu doborowi właściwego modelu badawczego i uważnie analizować otrzymane dane, gdyż uzyskane w niniejszych badaniach wyniki wyraźnie wskazują na istotne różnice w procesie rozwoju otyłości u myszy i prosiąt. Stąd też w świetle najnowszych wyników, także niniejszych eksperymentów, należałoby podejść ostrożnie do wcześniejszych hipotez dotyczących mechanizmów rozwoju stanu zapalnego u ludzi z nadwagą/otyłych.

4.4. LITERATURA

Cancello R., Tounian A., Poitou Ch., Clement K. 2004. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diab. Metab.*, 30(3), 215–227.

Caselli C. 2014. Role of adiponectin system in insulin resistance. *Mol. Genet. Metab.*, 113, 155–160.

Fasshauer M., Paschke R. 2003. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*, 46, 1594–1603.

Feurerer M., Herrero L., Cipolletta D., Naaz A., Wong J., Nayer A., Lee J., Goldfine A.B., Benoist C., Shoelson S., Mathis D. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.*, 15, 930–939.

Furman B.L. 2015. Streptozotocin-induced diabetic model in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, 70:5.47.1–20.

Hotamisligil G.S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860–867.

Joyner J.M., Hutley L.J., Cameron D.P. 2000. Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender variations. *J. Endocrinol.*, 166, 145–152.

Kershaw E.E., Flier J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89(6), 2548–2556.

Lê K.A., Mahurkar S., Alderete T.L., Hasson R.E., Adam T.C., Kim J.S., Beale E., Xie C., Greenberg A.S., Allayee H., Goran M.I. 2011. Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF- κ B stress pathway. *Diabetes*, 60(11), 2802–2809.

- Matsuzawa Y.** 2006. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.*, 580, 2917–2921.
- Monteiro R., Azevedo I.** 2010. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.*, 2010: 289645, doi:10.1155/2010/289645.
- Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., Seo K., Yamashita H., Hosoya Y., Ohsugi M., Tobe K., Kadowaki T., Nagai R., Sugiura S.** 2008. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 118, 710–721.
- Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., Eto K., Yamashita H., Ohsugi M., Otsu M., Hara K., Ueki K., Sugiura S., Yoshimura K., Kadowaki T., Nagai R.** 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.*, 15, 914–920.
- Rhen T., Cidlowsky J.A.** 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, 353(16), 1711–1723.
- Schmitz J., Evers N., Awazawa M., Nicholls H.T., Brönneke H.S., Dietrich A., Mauer J., Blüher M., Brüning J.C.** 2016. Obesogenic memory can confer long-term increases in adipose tissue but not liver inflammation and insulin resistance after weight loss. *Mol. Metab.*, 5(5), 328–339.
- Trayhurn P., Wood I.S.** 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, 92(3), 347–355.
- Wentworth J.M., Naselli G., Brown W.A., Doyle L., Phipson B., Smyth G.K., Wabitsch M., O'Brien P.E., Harrison L.C.** 2010. Pro-inflammatory CD11c+ CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*, 59, 1648–1656.
- Winer D.A., Winer S., Shen L., Wadia P.P., Yantha J., Paltser G., Tsui H., Wu P., Davidson M.G., Alonso M.N., Leong H.X., Glassford A., Caimol M., Kenkel J.A., Tedder T.F., McLaughlin T., Miklos D.B., Dosch H.M., Engleman E.G.** 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.*, 17, 610–617.
- Winer S., Chan Y., Paltser G., Truong D., Tsui H., Bahrami J., Dorfman R., Wang Y., Zielenski J., Mastronardi F., Maezawa Y., Drucker D., Engleman E., Winer E, Dosch H.M.** 2009. Normalization of obesity associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.*, 15, 921–929.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Główny obszar moich zainteresowań naukowych, począwszy od studiów magisterskich, poprzez studia doktoranckie, po aktualnie realizowane projekty, dotyczy szeroko pojętej odpowiedzi układu immunologicznego w zmiennych warunkach fizjologicznych. Szczególnie ważna jest możliwość regulowania nabywania procesu odporności/modulowania aktywności układu immunologicznego przy pomocy różnych czynników. Odporność organizmu wykształcona w wyniku długotrwałych procesów warunkowana jest interakcją wielu układów, z tym że, najważniejszym okresem nabywania odporności jest wzrost i rozwój poszczególnych układów w krótkim czasie po urodzeniu. Dlatego też badania przeprowadzane były na zwierzętach młodych i rosnących.

W trakcie studiów magisterskich (kierunek Zootechnika) na Wydziale Hodowli i Biologii i Zwierząt (WHiBZ) Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytetu Rolniczego) w Krakowie związałam się z Katedrą Fizjologii Zwierząt (obecnie Katedrą Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt). Podczas ostatnich lat studiów uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu układu glikokortykoidowego i opioidowego na układ odpornościowy, koordynowanych przez mojego promotora – prof. dr hab. Krystynę Pierzchałę-Koziec. Rezultatem prowadzonych doświadczeń była praca magisterska pt. *Wpływ dexametazonu i naltreksonu na wydzielanie in vitro met-enkefaliny z podwzgórza, przysadki i nadnerczy owiec*. Po ukończeniu studiów magisterskich i obronie pracy magisterskiej, rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale WHiBZ UR (2000-2004), kontynuując tym samym rozpoczętą pracę naukową w Katedrze.

Praca doktorska była kontynuacją badań w aspekcie odpornościowym, badania dotyczyły czynników modulujących aktywność układu immunologicznego. Opierając się na badaniach przeprowadzonych przez innych badaczy, z których wynikało, iż endogenne opioidy, w tym Met-enkefalina, pełnią jedną z głównych funkcji w regulacji odpowiedzi organizmu na stres między innymi poprzez hamowanie aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, podjęłam badania mające na celu wykazanie immunomodulacyjnego efektu tych endogennych peptydów. Wykazałam, że Met-enkefalina może odwracać immunosupresyjny efekt deksametazonu, analogu glikokortykoidu zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Podjęłam również próbę określenia udziału endogennych opioidów w modulowaniu reakcji stresowej wywołanej chorobą pasożytniczą u jagniąt od 3 do 9 miesiąca życia. Reakcja układu glikokortykoidowego na czynnik stresotwórczy jakim była inwazja pasożytów ulegała hamowaniu przez układ opioidowy w każdym okresie badań (różne okresy sezonu pastwiskowego) a największy wpływ opioidów zauważono w okresie rozpoczęcia sezonu pastwiskowego. Analizując zmiany stopnia proliferacji limfocytów krwi jagniąt podczas wszystkich okresów inwazji pasożytniczej wyraźnie wyróżniłam trzy stadia tzw. immunomodulacji: 1) supresji, 2) stymulacji i 3) odnowy, zakładając, iż pobudzenie układu immunologicznego jest procesem długotrwałym i niejednorodnym, uzależnionym od wielu innych czynników m.in. nerwowych i hormonalnych. Z przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań można było również wyciągnąć praktyczne, cenne i nowe wskazówki dla hodowców zwierząt. Z punktu widzenia fizjologii układu immunologicznego i endokrynnego owce, a szczególnie jagnięta, powinno się dodatkowo poddać odrobaczaniu przed wyjściem na pastwisko oraz po zakończeniu sezonu pastwiskowego wybierając takie środki odrobaczające, które mają jak najmniejszy wpływ na układ hormonalny i immunologiczny żywiciela. Ponadto, podawanie owcom analogów opioidów łącznie ze środkiem odrobaczającym przed wyjściem na pastwisko mogłoby złagodzić niekorzystne oddziaływanie pasożytów na organizm żywiciela. Rozprawa doktorska pt. *„Rola opioidów w immunosupresyjnym*

oddziaływaniu glikokortykoidów u owiec” uzyskała wyróżnienie a jej realizacja była możliwa dzięki finansowaniu m.in. z grantu przyznanego na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt (w latach 2002 – 2004), którego byłam kierownikiem.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań zostały częściowo opublikowane (Pierzchała-Koziec i wsp., 2001, zał.3, poz.II.D.1.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2001, zał.3, poz.II.D.3.; Zubel i wsp., 2002, zał.3, poz.II.D.4.; Zubel i wsp., 2003, zał.3, poz.II.D.7.; Zubel i wsp., 2004, zał.3, poz.II.D.10.; Zubel i wsp., 2004, zał.3, poz.II.D.11.).

Równoległe z realizacją badań dotyczących mojej pracy doktorskiej, zostałam włączona w prace doświadczalne prowadzone w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt UR. W 2001 roku byłam wykonawcą badań w ramach DS. 3243/KFZ/01 pt „Rola receptorów opioidowych i cholinergicznym w regulacji mechanizmów adaptacyjnych u zwierząt”. Celem podjętych badań było określenie interakcji receptorów opioidowych (mi, delta, kappa) oraz cholinergicznym (muskarynowych i nikotynowych) w tkankach zwierząt podczas adaptacji do zmiennych warunków (reakcje stresowe). Otrzymane wyniki wykazały współdziałanie układu parasympatycznego i opioidowego zarówno w czasie stresu jak i spokoju, co potwierdza rolę opioidów w tonicznym hamowaniu receptorów cholinergicznym.

W ramach tych badań jestem współautorką streszczeń konferencyjnych (Pierzchała-Koziec i wsp., 2001, zał.3, poz.III.B.1.; Zubel i wsp., 2001, zał.3, poz.III.B.3.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2001, zał.3, poz.III.B.5.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2002, zał.3, poz.III.B.10.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2003, zał.3, poz.III.B.20.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.91.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.92.).

Zostałam również włączona w badania kierowane przez prof. dr hab. Krystynę Pierzchałę-Koziec nad czynnikami wzrostu u zwierząt koordynując część dotyczącą wzajemnego wpływu/współdziałania tych czynników z układem immunologicznym. Byłam wykonawcą grantu (3P06D 001 22) pt „Udział opioidów w regulacji syntezy i sekrecji hormonu wzrostu i somatomedyn u owiec” realizowanego w Katedrze Fizjologii Zwierząt. Celem podjętych badań było określenie wpływu peptydów opioidowych na syntezę oraz wydzielanie hormonu wzrostu i somatomedyn u owiec w różnym wieku (3, 6, 9 – miesiąc życia). Wykazano, iż w trakcie wzrostu i rozwoju organizmu układ opioidowy w istotny sposób modulował poziom hormonu wzrostu i somatomedyn poprzez jego wpływ zarówno na syntezę jak i stopień sekrecji tych hormonów z tkanek rosnących owiec. Byłam również wykonawcą grantu nr 2P06D 022 30 pt „Udział greliny w kształtowaniu neuroimmunoendokrynych mechanizmów odporności u zwierząt”, kierowanym przez prof. dr hab. Krystynę Pierzchałę-Koziec. Celem podjętych badań było określenie wpływu egzogennej greliny na zmiany w układach: nerwowym, immunologicznym i endokrynym u rosnących jagniąt (30 – 60 dzień

życia) podczas modulowania aktywności układu immunologicznego poprzez długotrwałe podawanie prebiotyku – mannanu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż egzogenna grelina moduluje zmiany w układzie nerwowym (mierzone stopniem aktywności opioidów), immunologicznym (wpływ na poziom cytokin oraz proliferację limfocytów krwi obwodowej) oraz endokrynnym (zmiany aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, poziom GH, IGF) u jagniąt zarówno podczas stymulacji jak i hamowania procesu odpornościowego. Wykazano także wpływ czynników stymulujących (prebiotyk) i hamujących (glikokortykoidy) układ immunologiczny na syntezę greliny (zmiany w ekspresji genu kodującego mRNA progreliny) w mózgowiu i tkankach obwodowych podczas wzrostu jagniąt. Otrzymane wyniki potwierdziły zaangażowanie greliny w regulację procesów zachodzących w układzie nerwowym, immunologicznym i endokrynnym, a z przeprowadzonych badań wyciągnięto wnioski, iż grelina oddziałuje na wszystkie układy w ścisłej interakcji z systemem endogennych peptydów opioidowych. W tym czasie byłam również wykonawcą badań w ramach projektu DS. 3243/KFZ/07 pt „Udział greliny w procesach rozwoju i adaptacji młodych organizmów”. Celem podjętych eksperymentów było określenie wpływu egzogennej greliny na aktywność metaboliczną rosnących jagniąt, mierzoną zmianami poziomu insuliny w osoczu krwi. Dodatkowo zbadano wpływ przedłużonego podawania prebiotyku (czynnik stymulujący układ immunologiczny) na modulowanie współdziałania greliny i insuliny w rozwijającym się organizmie. Przeprowadzone badania wykazały wpływ przyżyciowych iniekcji greliny na poziom insuliny w osoczu krwi jagniąt. Kontynuując badania nad modulowaniem aktywności greliny przez różne czynniki byłam wykonawcą badań w projekcie pt” Wpływ czynników prozapalnych na syntezę i sekrecję greliny u rosnących owiec” - DS.3243/KFZ/09. W badaniach tych wykazano ścisłą interakcję pomiędzy czynnikami stymulującymi układ immunologiczny i aktywnością greliny.

Otrzymane w trakcie realizacji tych badań wyniki były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (Pierzchała-Koziec i wsp., 2003, zał.3, poz.III.B.14.,15.,16.,17.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2004, zał.3, poz.III.B.22.,27.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2005, zał.3, poz.III.B.30.,33.,34.,35.; Zubel i wsp., 2006, zał.3, poz.III.B.37.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.III.B.38.,39.; Octoń i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.90.; Zubel i wsp., 2009, zał.3, poz.III.B.79.; Zubel i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.94.).

Jestem również współautorką oryginalnych prac naukowych (Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.II.D.15.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.II.D.16.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2008, zał.3, poz.II.D.21.).

Uczestniczyłam również w badaniach nad wpływem różnych czynników w regulacji funkcji rozrodczych zwierząt. Byłam wykonawcą grantu (PBZ KBN 084 PO6/2002/3.10) pt „Rola układu opioidowego i glikokortykoidowego w regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej podczas

synchronizacji rui u owiec”, kierowanym przez prof. dr hab. Krystynę Pierzchałę-Koziec. Celem podjętych badań było określenie wpływu długotrwałego podawania progesteronu na syntezę i sekrecję opioidów z osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej oraz nadnerczowej w czasie synchronizacji rui u owiec. Ponadto, zaplanowano zbadanie roli agonistów i antagonistów receptorów opioidowych w modulowaniu wpływu progesteronu na aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej/nadnerczowej mierzoną poziomem steroidów i glikokortykoidów. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, iż długotrwałe podawanie progesteronu istotnie wpłynęło na endogenny układ opioidowy zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i na obwodzie, zmieniając syntezę prekursorów, wydzielanie wolnych form i regulując poziom opioidu w krwi. Egzogeny progesteron istotnie obniżył również stopień wiązania do wszystkich trzech typów receptorów opioidowych. Zauważono także wpływ progesteronu na poziom kortyzolu w krwi i jego wydzielanie z nadnerczy co wskazuje na ścisłą interakcję osi przysadkowo-nadnerczowej i przysadkowo-gonadowej. Zmiany wywołane przez progesteron oraz ich łagodzenie przez agonistę receptorów opioidowych potwierdziły udział układu opioidowego w regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej/nadnerczowej u owiec.

Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Pierzchała-Koziec i wsp., 2001, zał.3, poz.III.B.2; Zubel i wsp., 2001, zał.3, poz.III.B.6; Pierzchała-Koziec i wsp., 2002, zał.3, poz.III.B.14.,15.,16.,17.).

Jestem również współautorem publikacji przedstawiających uzyskane w trakcie niniejszych badań wyniki (Pierzchała-Koziec i wsp., 2003, zał.3, poz.II.D.8.; Wójcik-Gładysz i wsp., 2006, zał.3, poz.II.D.13.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.II.D.14.).

W kolejnych latach podjęłam badania nad interakcją układu pokarmowego i immunologicznego u młodych organizmów. Dużym problemem dla hodowców jest występująca powszechnie inwazja pasożytnicza przyczyniająca się do zaburzeń i zahamowania procesów wzrostu i rozwoju, częstych chorób, a nawet licznych upadków. Towarzyszą temu uszkodzenia przewodu pokarmowego, zapalenia błon śluzowych żołądka i jelit co pociągało za sobą konieczność podawania antybiotyków a w ostatnich latach zastąpienie farmaceutyków naturalnymi związkami – oligosacharydami (mannanem). Dlatego też skupiłam się na możliwość regulowania procesu nabywania odporności przy pomocy pozafarmakologicznych czynników stanowiących alternatywę dla antybiotyków. Temat ten rozwijałam będąc wykonawcą grantu (2P06D 022 30) pt „Udział greliny w kształtowaniu neuroimmunoendokrynnych mechanizmów odporności u zwierząt” kierowanego przez prof. dr hab. Krystyną Pierzchałą-Koziec. W badaniach tych zajmowałam się interakcją pomiędzy prebiotykami i innymi czynnikami w organizmie podczas pobudzenia układu odpornościowego. Rozwijając zainteresowanie immunologicznymi właściwościami mannanu jako kierownik

realizowałam również projekt pt „Wpływ zróżnicowanych dawek mannanu na stopień aktywności układu immunologicznego zwierząt gospodarskich” finansowany z przyznanego mi stypendium z Rektorskiego Funduszu Stypendialnego UR w Krakowie. Celem badań było określenie wpływu różnych dawek oligosacharydu – mannanu (prebiotyku) na proliferację limfocytów krwi obwodowej zwierząt gospodarskich oraz porównanie ich reakcji na ten sam czynnik w warunkach *in vitro*. Biorąc pod uwagę możliwość odmiennej odpowiedzi na prebiotyk doświadczenie zostało przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt gospodarskich: jagnięta, prosięta oraz na zwierzętach laboratoryjnych: myszy. Otrzymane wyniki wykazały dawkozależny, stymulujący wpływ mannanoligosacharydów na funkcje immunologiczne badanych zwierząt gospodarskich, oraz hamujący u zwierząt laboratoryjnych, a intensywność reakcji na ten prebiotyk nie była jednakowa u wszystkich zwierząt.

Wyniki dotyczące podjętego tematu prebiotyków były zamieszczone w streszczeniach konferencyjnych (Zubel i wsp., 2006, zał.3, poz.III.B.40; Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.III.B.41.,42.; Zubel i wsp., 2007, zał.3, poz.III.B.46.,50.,51.,52.,55.,57.; Fedorczak i wsp., 2007, zał.3, poz.III.B.47.,53.,56.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2007, zał.3, poz.III.B.49.,58.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2008, zał.3, poz.III.B.59.,66.; Zubel i wsp., 2008, zał.3, poz.III.B.60.,61.,62.,64.,65.,67.).

Jestem także współautorem publikacji (Pierzchała-Koziec i wsp., 2006, zał.3, poz.II.D.16.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2007, zał.3, poz.II.D.18.; Zubel i wsp., 2008, zał.3, poz.II.D.20.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2008, zał.3, poz.II.D.21.; Zubel i wsp., 2009, zał.3, poz.II.D.24.).

Przez ostatnie lata badania w których uczestniczyłam były skoncentrowane na schorzeniach metabolicznych i aktywnym wpływie produktów tkanki tłuszczowej na ich rozwój, ze szczególnym udziałem układu immunologicznego. Badania epidemiologiczne, dotyczące zapadalności na otyłość i związane z nią choroby metaboliczne, prowadzone w różnych krajach wykazują ciągły i narastający od ponad pół wieku wzrost zachorowań, szczególnie w wieku rozwojowym. Stąd tak duże zainteresowanie jednostek naukowych w poszukiwaniu markerów predyspozycji do rozwoju otyłości i jej powikłań. Wskazuje się również na nasiloną reakcję zapalną jak główny czynnik przyspieszający procesy chorobowe.

W latach 2009 – 2012 byłam wykonawcą projektu (NR 12 006406) pt „Opracowanie uniwersalnego modelu zwierzęcego do badań syndromu metabolicznego”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec. Celem podjętych badań było opracowanie uniwersalnego modelu zwierzęcego do badań syndromu metabolicznego ze szczególnym uwzględnieniem chorób sercowo-naczyniowych z wykorzystaniem rodzimych ras świni domowej. W efekcie przeprowadzonych eksperymentów opracowano metodykę indukcji zespołu metabolicznego u rodzimych, genetycznie zróżnicowanych, ras świń (PBZ oraz Puławskiej). W celu potwierdzenia

wystąpienia syndromu metabolicznego przeprowadzono szczegółową analizę biochemiczną osocza krwi zwierząt przy pomocy klasycznych wskaźników diagnostycznych. Wykazanie hiperglikemii, dyslipidemii oraz stanu zapalnego (3 z 5 parametrów diagnostycznych zespołu metabolicznego) pozwoliło na potwierdzenie indukcji zespołu metabolicznego. Wykazano, że prosięta rasy Puławskiej znacznie silniej zareagowały zmianami w gospodarce węglowodanowej, natomiast prosięta rasy PBZ charakteryzowały się szybkimi zmianami w trójglicerydach i cholesterolu. Odmienna również była odpowiedź mierzonych markerów zapalnych w tkance tłuszczowej oraz we krwi. Tak zróżnicowane reakcje potwierdziły trafność wyboru obu ras do eksperymentów o charakterze metabolicznym. Potwierdzono, że trzewna tkanka tłuszczowa nie jest tkanką jednorodną, a jej biologiczna aktywność jest wypadkową wielu czynników. Zaobserwowano również różny charakter zmian stężenia adipokin w indukowanym zespole metabolicznym u poszczególnych ras i ich udział w regulacji aktywności układu immunologicznego. Podsumowując otrzymane wyniki można wskazywać na różne zaangażowanie układu immunologicznego w przebiegu cukrzycy typu 1 i 2. Przydatnymi wskaźnikami do oceny aktywności układu immunologicznego w cukrzycy typu 1 mogą być: liczba leukocytów, proliferacja limfocytów, IL-6, TNF, wisfatyna, leptyna, NFkB. Natomiast w cukrzycy typu 2: CRP, rezystyna, leptyna, NFkB.

Chcąc poszerzyć prowadzone badania o głębszą analizę interakcji procesów odpornościowych i metabolicznych napisałam projekt skupiający się nad immunologicznymi właściwościami adipokin tkanki tłuszczowej. Projekt znalazł uznanie i zostałam laureatką stypendium ufundowanego przez Państwa Alinę i Jana Wagów w ramach Rektorskiego Funduszu Stypendialnego, przeznaczonego na wsparcie najciekawszych badań prowadzonych przez młodych pracowników UR w Krakowie. W ramach przyznanego stypendium kierowałam badaniami pt „Immunomodulacyjna reakcja tkanki tłuszczowej w zaburzeniach metabolicznych u zwierząt”. Głównym celem badawczym projektu było określenie roli wybranych adipokin tkanki tłuszczowej w modulowaniu odpowiedzi układu immunologicznego podczas zespołu metabolicznego. W planowanych badaniach podjęte zostały starania prześledzenia zmian substancji fizjologicznie czynnych tkanki tłuszczowej (adipokin) podczas stymulacji i hamowania układu odpornościowego. Modelem badawczym wykorzystanym do przeprowadzenia doświadczeń były zwierzęta laboratoryjne – myszy szczepu Swiss. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia i wykonania licznych analiz wykazano istotne zmiany w endokrynno-immunologicznej odpowiedzi organizmu zwierząt w przebiegu zespołu metabolicznego.

Uzyskane w trakcie przeprowadzanych w ramach przyznanego stypendium, ufundowanego przez Państwa Alinę i Jana Wagów, badań wyniki i powstałe w trakcie realizacji hipotezy zostały wykorzystane do przygotowania wniosku do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego o finansowanie projektu badawczego. Wniosek ten pt: „Immunomodulacyjna rola tkanki tłuszczowej w

rozwoju stanu zapalnego u zwierząt” został pozytywnie rozpatrzony (NN 311 227 138) i jako kierownik realizowałam go w latach 2010 – 2013. Celem zrealizowanego projektu było scharakteryzowanie przebiegu reakcji zapalnej w warunkach zaburzonego metabolizmu lipidowo-węglowodanowego oraz ocena wybranych adipokin jako markerów prognostycznych zapalenia. Podjęta została również próba określenia udziału hormonów osi HPA (CRH, ACTH, glikokortykoidy) w modulowaniu aktywności tkanki tłuszczowej. Doświadczenia zostały przeprowadzone na dwóch modelach badawczych, myszach oraz świni domowej, która dzięki podobieństwu do budowy i fizjologii człowieka wydaje się być szczególnie interesującym zwierzęciem modelowym. Wykorzystanie dwóch gatunków zwierząt pozwoliło na opracowanie pełnej charakterystyki zapalenia, wzbogaconej o analizę porównawczą, która umożliwi w przyszłości wprowadzenie nowych, poprawiających zdrowotność zwierząt praktyk hodowlanych. Wyniki otrzymane w trakcie realizacji przyznanego grantu zawarto w przygotowanej rozprawie habilitacyjnej (2018 r.) stanowiącej główne osiągnięcie naukowe.

W ramach rozwijania tematu podjętego w pracach badawczych prowadzonych w trakcie stypendium ufundowanego przez Państwa Alinę i Jana Wagów oraz w przyznanym grantie własnym, podjęłam nowe zagadnienie dotyczące „Udziału czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w aktywności prozapalnej trzewnej tkanki tłuszczowej w wybranych schorzeniach zespołu metabolicznego.” Analizy były przeprowadzane w ramach badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych z dotacji celowej, których byłam Kierownikiem (BM 4204, 2011 r.). Celem podjętych badań było określenie aktywności NF- κ B jako kluczowego modulatora odpowiedzi immunologicznej i zapalnej w osoczu krwi oraz trzewnej tkance tłuszczowej u zwierząt z indukowaną cukrzycą typu I i II, otyłością i ostrym stanem zapalnym (schorzeniami zaliczanymi do zespołu metabolicznego). Aktywność czynnika NF- κ B w trzewnej tkance tłuszczowej określono poprzez pomiar jego zmian w syntezie, stężeniu oraz sekrecji. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały iż, NF- κ B jest istotnym czynnikiem łączącym procesy zapalne (ostre i chroniczne) oraz schorzenia metaboliczne w obrębie trzewnej tkanki tłuszczowej. A prześledzenie aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B wraz z określeniem poziomu cytokin (IL-6, TNF) pozwoli na pełniejsze zrozumienie mechanizmów kontrolujących przebieg procesu zapalnego podczas zaburzeń metabolicznych. Kontynuując badania nad immunologicznymi właściwościami adipokin realizowałam również projekt DS.3243/KFZ/16 pt „Ocena aktywności komórek linii Nb2 i Baf3 w indukowanym stanie zapalnym”. Celem podjętych badań było określenie wpływu LPS oraz wisfatyny (adipokiny) na proliferację oraz sekrecję cytokin z komórek chłoniaka w warunkach wzmożonej aktywności układu immunologicznego. Wykazano zależny od dawki i czasu ekspozycji stymulujący

efekt LPS oraz hamujący wisfatyny na proliferację komórek chłoniaka szczura. Wydaje się, że wisfatyna dodana razem z LPS prawdopodobnie może odwracać jego toksyczny, pobudzający efekt.

Otrzymane w trakcie badań związanych z tkanką tłuszczową wyniki stanowiły podstawę prac inżynierskich i magisterskich powstałych w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, których byłam promotorem. Uzyskane wyniki dotyczące aktywności tkanki tłuszczowej i interakcji adipokin z innymi układami w organizmie były ponadto prezentowane na licznych konferencjach naukowych (Zubel i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.81.,88.,93.,96.; Octoń i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.84.,86., Fedorczak i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.85.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2010, zał.3, poz.III.B.87.,95.; Octoń i wsp., 2011, zał.3, poz.III.B.99.,104.,107.; Zubel i wsp., 2011, zał.3, poz.III.B.100.,101.,102.,106.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2011, zał.3, poz.III.B.103.,105.; Octoń i wsp., 2012, zał.3, poz.III.B.108.,109.,110.,112.,114.; Zubel i wsp., 2012, zał.3, poz.III.B.111.,113.,116.,117.; Latacz i wsp., 2012, zał.3, poz.III.B.115.; Zubel i wsp., 2013, zał.3, poz.III.B.123.,125; Zubel-Łojek i wsp., 2013, zał.3, poz.III.B.134; Octoń i wsp., 2013, zał.3, poz.III.B.119.,120.,122.,130.132.,133.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2013, zał.3, poz.III.B.127.; Latacz i wsp., 2013, zał.3, poz.III.B.124.,126.; Zubel-Łojek i wsp., 2014, zał.3, poz.III.B.137.,142.,146.; Octoń i wsp., 2014, zał.3, poz.III.B.138.,140.,144.; Zubel-Łojek i wsp., 2015, zał.3, poz.III.B.150.; Zubel-Łojek i wsp., 2016, zał.3, poz.III.B.155.,156.,157.; Zubel-Łojek i wsp., 2017, zał.3, poz.III.B.158.,160.,161.,162.; Zubel-Łojek i wsp., 2018, zał.3, poz.III.B.164).

Jestem także współautorem oryginalnych publikacji (Octoń i wsp., 2009, zał.3, poz.II.D.23.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2010, zał.3, poz.II.D.26.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2011, zał.3, poz.II.D.28.; Zubel i wsp., 2012, zał.3, poz.II.D.29.; Zubel-Łojek i wsp., 2014, zał.3, poz.II.D.31.; Zubel-Łojek i wsp., 2015, zał.3, poz.II.D.35.; Octoń i wsp., 2015, zał.3, poz.II.A.2.; Octoń i wsp., 2016, zał.3, poz.II.A.4.; Zubel-Łojek i wsp., 2016, zał.3, poz.II.A.5.)

Realizując swoje zainteresowania badawcze współpracowałam także z innymi jednostkami. Brałam udział w badaniach koordynowanych przez prof. dr hab. Krystynę Pierzchałę-Koziec we współpracy z Kliniką Pneumonologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rabce-Zdroju które były poświęcone badaniom regulacji przewlekłego procesu zapalnego w mysim modelu astmy oskrzelowej. Uczestniczyłam w przeprowadzaniu doświadczeń badając zmiany parametrów fizjologicznych (opioidy, leptyna, grelina, cytokiny, proliferacja limfocytów) w mózgowiu, tkankach obwodowych i w osoczu krwi, wpływających na przebieg przewlekłego procesu zapalnego. Współpracowałam także z Collegium Medicum UJ w Krakowie uczestnicząc w badaniach nad regulacją odpowiedzi immunologicznej i endokrynnej w przewlekłym zapaleniu wątroby u ludzi. W ramach doświadczeń przeprowadziłam hodowle tkankowe na dostarczonym materiale, badając wydzielanie *in vitro* hormonów z tkanek wątroby objętych procesem zapalnym. Wykonałam

oznaczenia parametrów fizjologicznych w medium inkubacyjnym oraz w tkankach (opioidy, TGF- β , grelina), wpływających na przebieg przewlekłego procesu zapalnego u ludzi. Otrzymywane w trakcie realizacji projektów wyniki dotyczące szeroko pojętej aktywności produktów tkanki tłuszczowej znalazły zainteresowanie w środowisku lekarskim zajmującym się chirurgią bariatryczną. Zaowocowało to podjęciem rozwijającej się współpracy z Okręgowym Szpitalem Kolejowym w Katowicach (Oddział Chirurgii Ogólnej z Pododdziałem Chirurgii Metabolicznej i Bariatrycznej) oraz Szpitalem Chirurgii Małoinwazyjnej i Rekonstrukcyjnej w Bielsku-Białej.

Wyniki uzyskane w badaniach prowadzonych z innymi ośrodkami zostały zaprezentowane na specjalistycznych konferencjach (Doniec i wsp., 2003, zał.3, poz.III.B.18.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2003, zał.3, poz.III.B.19.; Oćłoń i wsp., 2004, zał.3, poz.III.B.21.; Doniec i wsp., 2004, zał.3, poz.III.B.25.,28.; Cieśla i wsp., 2004, zał.3, poz.III.B.26.; Oćłoń i wsp., 2005, zał.3, poz.III.B.29.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2005, zał.3, poz.III.B.36.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2014, zał.3, poz.III.B.141.,145.).

Jestem także współautorem publikacji (Doniec i wsp., 2003, zał.3, poz.II.D.9.; Cieśla i wsp., 2007, zał.3, poz.II.D.17.; Tomaszewski i wsp., 2007, zał.3, poz.II.D.19.; Cieśla i wsp., 2008, zał.3, poz.II.D.22.; Cieśla i wsp., 2010, zał.3, poz.II.D.25.; Pierzchała-Koziec i wsp., 2014, zał.3, poz.II.D.32.; Lach i wsp., 2014, zał.3, poz.II.D.33.).

Zostałam zaproszona również do współpracy z Uniwersytetem Łódzkim (w latach 2013 – 2016) jako wykonawca grantu OPUS (2012/07/B/NZ4/00205) pt „Interakcje układu nerwowego i odpornościowego w mechanizmach kompensacyjnych na poziomie molekularnym i komórkowym”, pod kierownictwem prof. dr hab. Marka Wieczorka z Uniwersytetu Łódzkiego. W dalszym ciągu realizując swoje zainteresowania wzajemnym powiązaniem pomiędzy układem nerwowym i immunologicznym brałam czynny udział w przeprowadzeniu doświadczeń oraz wykonałam analizy czynników zapalnych w zebranych materiale. Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki są aktualnie opracowywane.

Podsumowując wyniki osiągnięte podczas badań prowadzonych przeze mnie w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie można stwierdzić, że dotyczą one różnorodnych aspektów odporności nabytej zwierząt i ludzi podczas ostrego i przewlekłego procesu zapalnego z uwzględnieniem immunomodulacyjnych właściwości neurohormonów, hormonów procesów metabolicznych oraz cytokin.

Moja dotychczasowa praca naukowa była realizowana w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN, MNiSW oraz ze środków na działalność statutową. Kierowałam 1 projektem NCN, oraz 4 projektami wewnętrznymi finansowanymi ze środków MNiSW na działalność


statutową. Byłam wykonawcą w 8 projektach krajowych oraz laureatką 2 stypendiów w ramach Rektorskiego Funduszu Stypendialnego.

Wyniki badań, w których uczestniczyłam, zostały opublikowane w 42 oryginalnych pracach naukowych i zaprezentowane w postaci 164 doniesień konferencyjnych w kraju (65) i za granicą (99).

Do moich obowiązków oprócz pracy naukowej należy również działalność dydaktyczna. Od momentu zatrudnienia na Uniwersytecie Rolniczym prowadzę zajęcia dydaktyczne (ćwiczenia i wykłady) w wymiarze przekraczającym pensum ze studentami kierunków Biologia, Zootechnika, Bioinżynieria zwierząt i Rybactwo śródlądowe i ochrona środowiska wodnego WHiBZ UR, kierunku Biotechnologia WBiO UR oraz kierunku Weterynaria Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR. Byłam promotorem 26 zakończonych prac inżynierskich i 24 magisterskich. Wykonałam recenzje 16 prac inżynierskich. Aktywnie uczestniczę w popularyzacji nauki prowadząc pokazy i zajęcia organizowane w ramach Festiwalu Nauki, Małopolskiej Nocy Naukowców oraz Uniwersytetu dla Młodzieży.

Pozostałe osiągnięcia naukowe oraz dydaktyczne przedstawiono w „Wykazie opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” (ZAŁĄCZNIK 3).

Kraków, dn. 07.01.2019 r.


dr inż. Joanna Zubel-Łojek