

Załącznik 2

Dr Piotr Dobrowolski

Autoreferat

**Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii**

Lublin 2017

1. **Imię i nazwisko:** PIOTR DOBROWOLSKI

2. **Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, 2009, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi.

Tytuł rozprawy doktorskiej wykonanej w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii: „Preparat włókna ziemniaczanego – Povex a oddziaływanie akrylamidu na jelito cienkie”

Promotor: prof. dr hab. Antoni Gawron

Magister biologii w zakresie biologii ogólnej, 2001, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi.

Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii: „Populacja susła perełkowanego (*Spermophilus suslicus*) w Świdniku.”

Promotor: prof. dr hab. Antoni Gawron

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

Od 01.11.2001 do 30.09.2009: asystent w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Od 01.10.2009 do 30.09.2013: adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Od 01.10.2013 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

4. **Wykazanie 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. 2016r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016r. poz. 1311.):

a. tytuł osiągnięcia naukowego:

Wpływ egzogenego kwasu 2-oksoglutazarowego na tkankę chrzęstną i kostną w warunkach prawidłowego rozwoju oraz w indukowanej osteopenii.

b. publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Tomaszewska E, **Dobrowolski P**, Wydrych J (2012) Postnatal administration of 2-Oxoglutaric acid improves articular and growth plate cartilages and bone tissue morphology in pigs prenatally treated with dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 63, 547-554. *IF: 2,476, MNiSW: 25, Mój udział procentowy szacuję na 32%.*

2. **Dobrowolski P**, Tomaszewska E, Radzki RP, Bienko M, Wydrych J, Zdybel A, Pierzynowski SG (2013) Can 2-oxoglutarate prevent changes in bone evoked by omeprazole? *Nutrition* 29, 556-561. *IF: 3,046, MNiSW: 30, Mój udział procentowy szacuję na 86%.*

3. **Dobrowolski P**, Tomaszewska E, Bieńko M, Radzki RP, Pierzynowski SG (2013) The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats. *Brit J Nutr* 110, 651-658. *IF: 3,342, MNiSW: 35, Mój udział procentowy szacuję na 88%.*

4. Tomaszewska E, **Dobrowolski P**, Bieńko M, Prost Ł, Szymańczyk S, Zdybel A (2015) Effects of 2-oxoglutaric acid on bone morphometry, densitometry, mechanics, and immunohistochemistry in 9-month-old boars with prenatal dexamethasone-induced osteopenia. *Connect Tissue Res* 56(6), 483-492. *IF: 1,411, MNiSW: 20, Mój udział procentowy szacuję na 50%*.
5. **Dobrowolski P**, Tomaszewska E, Kurlak P, Pierzynowski SG (2016) Dietary 2-oxoglutarate mitigates gastrectomy-evoked structural changes in cartilage of female rats. *Exp Biol Med*, 241, 14-24. *IF: 2,542, MNiSW: 25, Mój udział procentowy szacuję na 91%*.
6. **Dobrowolski P**, Tomaszewska E, Muszyński S, Blicharski T, Pierzynowski SG (2017) Dietary 2-oxoglutarate prevents bone loss caused by neonatal treatment with maximal dexamethasone dose. *Exp Biol Med*, 242, 671-682. *IF: 2,542, MNiSW: 30, Mój udział procentowy szacuję na 90%*.

Sumaryczny Impact Factor wymienionych publikacji (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **15,359**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **165**. Sumaryczny Impact Factor publikacji wyliczony zgodnie z najnowszą dostępną punktacją (2017) wynosi **15,449** natomiast suma punktów MNiSW zgodnie z najnowszą punktacją (2017) wynosi **165**. Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie tych prac znajduje się w załączniku nr 4.

c. omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Metabolizm tkanki chrzęstnej jak i kostnej podlega zmianom wraz z wiekiem oraz stanem zdrowia. Tkanka łączna podlega regulacji przez liczne czynniki, spośród których do najważniejszych należą: poziom hormonów oraz dostępność i przyswajalność składników odżywczych. Jednocześnie trzeba mieć na uwadze, że dwie najbardziej istotne dla prawidłowego funkcjonowania szkieletu odmiany tkanki łącznej – czyli tkanka chrzęstna i kostna są zupełnym swoim przeciwieństwem jeśli chodzi o tempo metabolizmu, a co z tym związane charakteryzują się zupełnie odmiennymi właściwościami regeneracyjnymi. Ponadto szkielet będąc bierną częścią narządu ruchu podlega nieustannie oddziaływaniom fizycznym kształtującym jego strukturę wewnętrzną. Stąd też można przyjąć, że z punktu widzenia świadomego działania człowieka, elementami wpływającymi na rozwój tkanki kostnej i chrzęstnej oraz zachowanie równowagi metabolicznej tych tkanek są zbilansowana dieta oraz aktywność fizyczna.

Tkanka łączna podporowa podlega również oddziaływaniu czynników chorobowych. Pomijając infekcje bakteryjne i wirusowe istnieje wiele chorób metabolicznych, wrodzonych gdzie o ich etiologii decydują wady genetyczne, lub niewłaściwa dieta. Choroby te często mają pośredni lub bezpośredni wpływ na nasz szkielet. W przypadku zdiagnozowania choroby pojawia się konieczność jej leczenia. Wdraża się zatem terapie, które mają skutkować przywróceniem utraconej równowagi metabolicznej. Niestety duża część stosowanych terapii farmakologicznych jak i chirurgicznych jest obciążona skutkami ubocznymi, które nie pozostają obojętne również wobec szkieletu. Logiczną konsekwencją takiej sytuacji są dwa rozwiązania: poszukiwanie terapii, które nie będą obciążone skutkami ubocznymi lub próba łagodzenia tych skutków poprzez wspomaganie leczenia za pomocą różnych substancji lub

diety. Można wyróżnić wiele grup substancji biologicznie czynnych, których zastosowanie ma wspomagać sam metabolizm lub terapie lekowe stosowane w celu regulacji metabolizmu, m.in.: witaminy, makro i mikroelementy, nienasycone kwasy tłuszczowe, aminokwasy oraz ich prekursory, i inne.

Moją uwagę zwrócił kwas 2-oksoglutarynowy (2-Ox, α -ketoglutarynowy, AKG) ze względu na szereg doniesień literaturowych, które podkreślały jego ochronne właściwości w przypadkach osteoporozy indukowanej owariektomią lub gastrektomią, a także możliwość jego zastosowania w przypadkach wspomagania leczenia osteoporozy u kobiet w okresie menopauzy. Kwas 2-oksoglutarynowy jest substancją naturalną, powszechnie występującą w organizmach żywych. To kluczowy związek pośredni wielu szlaków metabolicznych m.in. cyklu Krebsa. Bierze udział w metabolizmie energetycznym komórki, oraz metabolizmie aminokwasów. Wiąże azot i spełnia rolę transportera węgla, ponadto nie wykazuje właściwości toksycznych. Kwas 2-oksoglutarynowy jest bardzo istotnym prekursorem glutaminy, będącej paliwem oksydacyjnym dla szybko dzielących się komórek jak limfocyty i fibroblasty, jak również prekursorem proliny, asparaginy i argininy. Jego podawanie drogą pokarmową może zwiększać dostępną pulę aminokwasów „kolagenowych” gdyż brak jest możliwości wykorzystania 2-Ox z cyklu kwasów trójkarboksylowych w syntezie tych aminokwasów. Ponadto, w przeciwieństwie do glutaminy, 2-Ox jest wysoce stabilny w roztworach wodnych, co jest bardzo istotne w przypadku podawania drogą pokarmową gdzie przekształcany jest w enterocytach do proliny, leucyny i innych aminokwasów. Ponadto 2-Ox, poprzez różne mechanizmy, bezpośrednio i pośrednio zaangażowany jest w metabolizm kolagenu, np.: będąc prekursorem aminokwasów kolagenowych; uczestnicząc w procesie post-translacyjnej hydroksylacji reszt proliny i lizyny przy udziale jonów Fe^{2+} , kwasu askorbinowego i tlenu; czy też będąc kofaktorem w procesie absorpcji Fe^{2+} w jelicie cienkim. Co więcej, jelitowa suplementacja 2-Ox może podnosić w osoczu poziom insuliny, hormonu wzrostu oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu i poprawiać absorpcję aminokwasów oraz przeciwdziałać utracie tkanki kostnej.

W związku z powyższym zostały przeze mnie przeprowadzone badania, których wyniki zamieściłem w artykułach wchodzących w skład omawianego osiągnięcia naukowego. Głównym obszarem moich zainteresowań naukowych jest zmienność struktury histologicznej tkanki chrzęstnej i kostnej w relacji z układem pokarmowym w okresie rozwoju. Szczególnie interesująca jest możliwość wpływania na zachowanie równowagi metabolicznej, regenerację lub zmniejszenie skutków ubocznych w przypadkach coraz częściej stosowanych terapii mających na celu walkę z otyłością lub wadami rozwojowymi, pojawiającymi się wraz z nasilonym rozwojem cywilizacyjnym. Niejednokrotnie skutkiem ubocznym stosowania operacji bariatrycznych, terapii glikokortykoidami, lub stosowania inhibitorów pompy protonowej jest obniżenie gęstości mineralnej kości – osteopenia.

Swoje badania oparłem na dwóch modelach zwierzęcych: świni domowej i szczurze laboratoryjnym oraz kilku zmiennych środowiskowych i osobniczych takich jak: wiek (od rozwoju

prenatalnego do fazy dojrzewania), prenatalny oraz postnatalny wpływ glikokortykoidów oraz farmakologiczna i chirurgiczna regulacja układu pokarmowego.

Glikokortykoidy, ze względu na swoje właściwości przeciwzapalne i immunosupresyjne, są powszechnie stosowane w praktyce pediatrycznej w leczeniu m. in. przewlekłej choroby płuc, astmy czy krup lub reumatoidalnego zapalenia stawów, a także do zmniejszenia śmiertelności u wcześniaków z zespołem zaburzeń oddychania (zespół błon szklistych) związanego z niedojrzałością płuc czy niedoborem endogennego surfaktantu. Ponadto coraz większa grupa dzieci podlega chronicznej ekspozycji na glikokortykoidy ze względu na zwiększającą się częstotliwość chorób atopowych związanych z zanieczyszczeniem środowiska oraz wysoko przetworzoną żywnością. Szacuje się że nawet 10% dzieci w Europie podlega lub wymaga leczenia glikokortykoidami. Co więcej, leki z tej grupy wykorzystywane są również w ciąży, dla zmniejszenia częstotliwości powikłań i umieralności noworodków, m.in. stymulując dojrzewanie układu oddechowego płodu, jak również w porodach z cięciem cesarskim a także terminowych porodach.

Chociaż glikokortykoidy stosowane są w położnictwie już od ponad czterdziestu lat, stosowanie tego rodzaju terapii nadal rodzi wiele pytań i wątpliwości co do dawkowania, rodzaju konkretnych substancji, korzyści leczenia i zagrożeń związanych z długofalowymi skutkami dla rozwoju. Pomimo niewątpliwych korzyści płynących ze stosowania glikokortykoidów wzrasta liczba dowodów na negatywne skutki ich działania, do których należą: tłumienie osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, zmniejszenie przyrostu masy ciała, utrata masy kostnej, opóźnienie wzrostu, a także wiele innych. Poza tym, osteoporoza wywoływana przez glikokortykoidy jest najczęstszą jatrogenną przyczyną osteoporozy wtórnej jako długoterminowy efekt uboczny klinicznego stosowania glikokortykoidów. Dzieci leczone glikokortykoidami charakteryzują się niższą gęstością mineralną kości kręgosłupa i większą częstością złamań w porównaniu do zdrowych. Proponuje się kilka możliwych mechanizmów powstawania osteoporozy indukowanej glikokortykoidami. Z jednej strony zahamowanie procesu kościotworzenia poprzez zaburzenie równowagi komórkowej związane ze zwiększoną apoptozą i zmniejszoną aktywnością osteoblastów oraz osteocytów z równoczesnym oddziaływaniem glikokortykoidów na proporcje białek regulatorowych. Z drugiej strony, szybka utrata tkanki kostnej związana ze zmniejszoną syntezą białek, takich jak kolagen lub osteokalcyna, a także zakłócenia w sygnalizacji komórkowej prowadzące do nieprawidłowego działania mechanizmów naprawczych i niestabilności kości w wyniku gromadzenia się mikrouszkodzeń. Dodatkowo, zalecenia, oparte na dowodach naukowych, dotyczące terapii u dzieci wymagających długotrwałego zastosowania glikokortykoidów nie są wystarczające chociażby ze względu na niewielką ilość badań klinicznych. Zatem opcje leczenia osteoporozy indukowanej glikokortykoidami u dzieci również są znacznie ograniczone. Badania w tym zakresie zawierają ograniczone informacje dotyczące bisfosfonianów, witaminy K2, D, kalcytriolu i suplementacji wapniem.

Biorąc pod uwagę powyższe problemy związane z zastosowaniem glikokortykoidów w okresie pre- i postnatalnym oraz towarzyszące im skutki uboczne w postaci osteopenii, jak również własności

kwasu 2-oksoglutarynowego i doniesienia o jego ochronnych właściwościach odnośnie szkieletu, postanowiono zweryfikować hipotezę o możliwości łagodzenia lub eliminacji skutków ubocznych stosowania glikokortykoidów poprzez wspomaganie leczenia za pomocą kwasu 2-oksoglutarynowego. W związku z tym wykonano trzy doświadczenia (wymienione w podpunktach b.1, b.4, b.6) z użyciem roztworów wody do pica zawierających kwas 2-oksoglutarynowy u świń, u których indukowano osteopenię poprzez pre- lub postnatalne, domięśniowe podawanie glikokortykoidu (deksametazonu, syntetycznego glikokortykoidu, Dex). Oceniano zmiany w tkance kostnej i chrzęstnej spowodowane przez pre- lub postnatalne podawanie glikokortykoidów oraz efekty podawania kwasu 2-oksoglutarynowego zwierzętom z osteopenią indukowaną glikokortykoidami.

Deksametazon, w pierwszym i drugim doświadczeniu (b.1, b.4) podawano ciężarnym maciorom przez ostatnie 45 dni ciąży, natomiast w trzecim doświadczeniu (b.6) deksametazon podawano prosiętom od urodzenia do okresu odsadzenia to jest do 35 dnia życia. Kwas 2-oksoglutarynowy otrzymywały prosięta drogą pokarmową (w roztworze wodnym) od urodzenia do odsadzenia w 35 dniu życia we wszystkich trzech doświadczeniach, przedłużając okres suplementacji 2-Ox do 9-go miesiąca życia w drugim doświadczeniu (b.4). Materiał do analiz stanowiły tkanki pobrane od prosiąt.

Prenatalne podawanie deksametazonu powodowało u prosiąt w okresie odsadzenia (b.1) obniżenie masy kości długich, zmniejszenie ich wytrzymałości mechanicznej i sprężystości u obu płci, a dodatkowo u samców zmniejszenie mineralizacji kości. Obserwowano ponadto zmniejszenie grubości przynasadowej chrząstki wzrostowej, przy czym największy wpływ deksametazonu obserwowano w warstwach dojrzewania oraz mineralizacji. Redukcję grubości zanotowano również w obrębie chrząstki stawowej u samców w warstwach przejściowej i promieniowej. Deksametazon podawany prenatalnie zwiększał liczbę chondrocytów, przy jednoczesnym zmniejszeniu grubości chrząstki, co świadczyło o pogorszeniu wydolności tych komórek. Obserwowana zmiana proporcji komórek do substancji międzykomórkowej, zwłaszcza w chrząstce stawowej, może prowadzić do pogorszenia jej właściwości mechanicznych co w następstwie może prowadzić do jej szybszego zużycia i niszczenia. Ponadto, deksametazon redukował grubość beleczek kostnych a także powodował liczne mikrouszkodzenia w ich obrębie. Deksametazon podwyższał u samic poziom alkalicznej fosfatazy kostnej, który korelował z obrazem histologicznym, nasilonego procesu resorpcji tkanki kostnej. Scharakteryzowane objawy świadczą o wystąpieniu osteopenii u badanych zwierząt i potwierdzają negatywne oddziaływanie glikokortykoidów, stosowanych prenatalnie, na rozwój kości u potomstwa, choć Dex nie miał istotnego wpływu na poziom hormonu wzrostu i osteokalcyny we krwi.

Z drugiej strony postnatalna pokarmowa suplementacja kwasem 2-oksoglutarynowym aż do okresu odsadzenia (b.1) zwiększała masę kości długich, poprawiała ich właściwości mechaniczne i zwiększała mineralizację kości w porównaniu do prosiąt poddanych prenatalnemu wpływowi deksametazonu. Co więcej, u prosiąt samic otrzymujących kwas 2-oksoglutarynowy mineralizacja kości była nawet wyższa niż w kontroli. Ponadto 2-Ox zwiększał grubość chrząstki wzrostowej i stawowej, zapobiegając tym samym destrukcyjnemu działaniu deksametazonu. Grubość chrząstki stawowej

u samców otrzymujących 2-Ox była nawet większa niż u zwierząt kontrolnych. Co ciekawe, większa grubość chrząstki stawowej nie wiązała się ze wzrostem liczby chondrocytów. Zatem, najprawdopodobniej 2-Ox pozytywnie wpływał na metabolizm komórek chrząstki.

Oprócz tego 2-Ox przeciwdziałał zmniejszaniu się grubości beleczek kostnych przez deksametazon. Czyli zarówno w tkance chrzęstnej jak i kostnej kwas 2-oksoglutarynowy wykazywał działanie ochronne. Ponadto samice prosiąt otrzymujących 2-Ox miały zwiększony poziom hormonu wzrostu.

Skutki podawania deksametazonu ciężarnym samicom były obserwowane u potomstwa jeszcze 9 miesięcy po porodzie (b.4). Obserwowano istotną redukcję masy ciała oraz masy i długości kości. Utrzymywał się również obniżony poziom parametrów mechanicznych, geometrycznych oraz zmniejszona mineralizacja kości. Pomimo braku wpływu na całkowitą grubość chrząstki stawowej skutki prenatalnej ekspozycji na glikokortykoidy widoczne były w jej strukturze, gdzie warstwy powierzchniowa i promieniowa były wyraźnie cieńsze niż w kontroli, ale warstwa przejściowa niemal dwa razy grubsza. Podobnie, jak w okresie odsadzenia, Dex zmniejszał całkowitą grubość chrząstki wzrostowej, przy czym cieńsze były warstwy spoczynkowa, i kostnienia, natomiast grubsza warstwa proliferacji. Ponadto Dex zmniejszał całkowitą objętość tkanki kostnej i grubość beleczek kostnych a zwiększał przestrzeń pomiędzy beleczkami. Obserwowano również obniżoną ekspresję osteokalcyny w beleczkach kostnych, osteocytach i płycie wzrostowej, natomiast zwiększoną w chrząstce stawowej.

Prenatalne oddziaływanie glikokortykoidów powodowało zmianę aktywności chondrocytów, gdyż zaczęły one wytwarzać charakterystyczną dla kości osteokalcynę, w związku z czym zmianom uległa również macierz zewnątrzkomórkowa. Dodatkowe analizy wykazały także obniżoną zawartość proteoglikanów oraz kolagenu drobnowłóknistego w chrząstce stawowej. Cechy te świadczą o pogorszeniu właściwości mechanicznych chrząstki stawowej oraz zaburzonym procesie jej przebudowy spowodowanym prenatalnym wpływem glikokortykoidów. Zatem, podobnie jak w okresie odsadzenia, obserwowano objawy osteopenii u zwierząt 9-cio miesięcznych po prenatalnym zastosowaniu deksametazonu. Jednakże w tym przypadku najprawdopodobniej doszło do utrwalenia nieprawidłowego rozwoju kośćca, wywołanego przez prenatalne działanie glikokortykoidów, o czym świadczyły obniżony poziom insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 i alkalicznej fosfatazy kostnej.

Wydłużenie okresu suplementacji 2-Ox nie wpłynęło natomiast na istotną poprawę parametrów obniżonych przez prenatalne zastosowanie glikokortykoidów, a mianowicie: masy ciała, mechaniki, geometrii czy mineralizacji kości. Kwas 2-oksoglutarynowy nie wpłynął również znacząco na grubość chrząstki stawowej, chociaż warstwy powierzchniowa i promieniowa były nieco cieńsze niż w kontroli, a warstwa przejściowa niemal dwa razy grubsza. Natomiast 2-Ox zwiększał całkowitą grubość chrząstki wzrostowej, nawet ponad wartości obserwowane w grupie kontrolnej – czyli odwracał efekt prenatalnego podawania Dex, zwiększając grubość każdej warstwy, a warstwy spoczynkowej i kostnienia istotnie w stosunku do Dex. Kwas 2-oksoglutarynowy zwiększał także znamienne grubość warstwy proliferacyjnej w stosunku do kontroli. Słaby efekt protekcyjny 2-Ox wywierał natomiast na

beleczek kostne. Suplementacja 2-Ox zapobiegała także utracie proteoglikanów w chrząstce stawowej. Kwas 2-oksoglutarynowy zwiększał także ilość kolagenu drobnowłóknistego, a rozkład kolagenu w tkance zachował strukturę typową dla kontroli. A zatem 2-Ox przywracał właściwy dla chrząstki stawowej rozkład kolagenu. Ponadto 2-Ox zwiększał istotnie zawartość insulinopodobnego czynnika wzrostu zmniejszając niekorzystny efekt prenatalnego oddziaływania glikokortykoidów. Nie miał natomiast wpływu na poziom alkalicznej fosfatazy kostnej.

Długotrwała suplementacja 2-Ox zwiększała ekspresję osteokalcyny w płytce wzrostowej i beleczkach kostnych jednocześnie zmniejszając ją w chrząstce stawowej, tym samym wykazała działanie protekcyjne w stosunku do prenatalnego oddziaływania deksametazonu.

Reasumując, podawanie kwasu 2-oksoglutarynowego drogą pokarmową zmniejszało, a nawet odwracało proces degeneracji chrząstki indukowany przez prenatalne oddziaływanie glikokortykoidów, niezależnie od długości okresu suplementacji. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę wyniki obu przedstawionych doświadczeń, suplementacja 2-Ox po okresie odsadzenia nie wpływała na opóźniony rozwój tkanki kostnej ani osłabione właściwości mechaniczne kości, chociaż zdecydowanie poprawiała stan chrząstki stawowej i wzrostowej. Istnienie określonych okresów wrażliwości rozwojowej, zwanych oknami programowania prenatalnego i postnatalnego rozwoju mogło mieć tutaj decydujące znaczenie gdyż utrwalone w długim okresie czasu zmiany w tkance kostnej powstałe pod wpływem prenatalnego nadmiaru glikokortykoidów nie były możliwe do odwrócenia. Zatem można wyciągnąć wniosek, że to właśnie początkowe etapy rozwoju, charakteryzujące się najintensywniejszym wzrostem są okresem najbardziej podatnym na oddziaływanie 2-Ox w przypadku prenatalnej ekspozycji na glikokortykoidy.

Postnatalny wpływ glikokortykoidów wraz z towarzyszącą suplementacją 2-Ox badano w trzecim doświadczeniu (b.6), gdzie zarówno deksametazon jak i kwas 2-oksoglutarynowy podawano prosiętom od urodzenia do okresu odsadzenia w 35 dniu życia. Również i w tym przypadku deksametazon powodował znaczący spadek masy ciała, kości i ich długości. Deksametazon zdecydowanie obniżał także wytrzymałość mechaniczną i elastyczność kości, które charakteryzowały się również cieńszymi ścianami trzonów oraz zmniejszoną mineralizacją tkanki kostnej. Ponadto analiza histomorfometryczna i histologiczna potwierdzały wystąpienie osteopenii, a nawet osteoporozy, co przejawiało się m.in. wzrostem wymiaru fraktalnego beleczek kostnych. Innymi słowy, prenatalnie podawany deksametazon zwiększał stopień skomplikowania linii brzegowej beleczek kostnych (ich powierzchni), tym samym rozwijając powierzchnię dostępną dla osteoklastów. Zanotowano również radykalnie zwiększoną ilość pęknięć i szczelin w strukturze beleczek kostnych czyniących je bardziej podatnymi na dalsze uszkodzenia.

Deksametazon zmniejszał objętość kości gąbczastej i grubość beleczek kostnych, przez co w obrazie histologicznym widoczne stały się objawy ubytku tkanki kostnej, charakterystyczne dla osteoporozy. W obrazie histologicznym zaobserwowano także zwiększenie ilości i powierzchni obszarów osteoidu, niezmineralizowanej kości, u prosiąt otrzymujących sam deksametazon, a także

zwiększoną liczbę jamek kostnych oraz hipertrofię osteocytów. Biorąc pod uwagę strukturę histologiczną tkanki kostnej blaszkowatej Dex musiał wpłynąć na zaburzenie procesu formowania blaszek kostnych budujących strukturę osteonów. Co za tym idzie, cieńszym i liczniejszym blaszkom towarzyszyła mniejsza ich wytrzymałość i wydłużenie procesu przebudowy, a zatem pogorszenie właściwości adaptacyjnych szkieletu, a w konsekwencji możliwe wady rozwojowe wzrastającego organizmu.

Ponadto podawany postnatalnie deksametazon zmniejszał poziom hormonu wzrostu, insulinopodobnego czynnika wzrostu 1, osteokalcyny, kortyzolu i mocznika. W przeciwieństwie do terapii prenatalnej, Dex podawany postnatalnie nie wpłynął na poziom alkalicznej fosfatazy kostnej. Odnotowano natomiast zwiększone stężenie glicyny, glutaminy i glutaminianu oraz zmniejszony poziom proliny w surowicy, co dodatkowo może świadczyć o obniżeniu syntezy kolagenu, zatem pośrednio tłumaczyć ubytek tkanki kostnej, poza spadkiem jej mineralizacji.

Suplementacja pokarmowa kwasem 2-oksoglutarynowym w dużej części zapobiegała utracie masy ciała, istotnie poprawiając ten parametr, ale nie odwracała całkowicie działania glikokortykoidu. Podobnie, 2-Ox zapobiegał utracie masy kości i ich długości, jednocześnie istotnie poprawiając parametry mechaniczne i geometryczne kości, zmniejszając, a nawet odwracając niekorzystne oddziaływanie glikokortykoidu. Najwyraźniej postnatalne oddziaływanie suplementacji 2-Ox zaobserwowano w kości ramiennej gdzie niemal odwrócił on działanie Dex. Kwas 2-oksoglutarynowy zwiększył mineralizację kości, mocno zredukowaną przez Dex, jednakże nie do poziomu kontroli. Suplementacja 2-Ox bardzo wyraźnie poprawiała właściwości struktury mikroskopowej badanych kości. Kwas 2-oksoglutarynowy w pełni zapobiegał wzrostowi wymiaru fraktalnego, zwiększał objętość kości beleczkowej i grubość, jednocześnie zmniejszając wielkość i ilość obszarów kości niezmineralizowanej, zapobiegając niemal w pełni oddziaływaniu postnatalnemu glikokortykoidu. Ponadto suplementacja 2-Ox zapobiegała wzrostowi ilości jamek kostnych i hipertrofii osteocytów, zwiększała poziom hormonu wzrostu, osteokalcyny, mocznika, kwasu moczowego i kreatyniny w surowicy krwi. Poziomy hormonu wzrostu, kwasu moczowego i kreatyniny były nawet większe niż u zwierząt kontrolnych. Z drugiej strony odnotowano obniżenie poziomów glicyny, glutaminy i glutaminianu oraz zwiększenie poziomu proliny pod wpływem jednoczesnego podawania 2-Ox w stosunku do samego Dex.

Powyższe wyniki i obserwacje przedstawionych doświadczeń z indukowaną osteopenią pozwoliły na wysunięcie kilku wniosków. Zarówno prenatalna jak i postnatalna ekspozycja na nadmiar glikokortykoidów znacząco upośledza prawidłowy rozwój szkieletu a utrwalone w długim okresie czasu upośledzenie rozwoju organizmu powoduje w dużej części nieodwracalne zmiany. Z drugiej strony, na wczesnym etapie rozwoju obserwowane zmiany w szkielecie były odwracalne częściowo, a niekiedy nawet całkowicie, przez wzbogacenie pokarmu kwasem 2-oksoglutarynowym, który wykazał bardzo dobre właściwości protekcyjne. Ponadto, 2-Ox wykazywał również działanie protekcyjne tkanki chrzęstnej zwierząt dojrzałych, których rozwój był upośledzony przez prenatalne oddziaływanie nadmiaru glikokortykoidów.

Wiedza zdobyta na podstawie powyższych doświadczeń może stać się przyczynkiem do powstania nowych złożonych terapii wykorzystujących kwas 2-oksoglutaryny jako substancję pomocniczą w leczeniu dzieci wymagających prenatalnej lub postnatalnej interwencji z wykorzystaniem glikokortykoidów. Cechy takie jak brak toksyczności, naturalny charakter substancji, jej udział w metabolizmie energetycznym i aminokwasów, właściwości protekcyjne w stosunku do tkanki łącznej w przypadku ekspozycji na glikokortykoidy oraz dane o wykorzystaniu u ludzi dorosłych w prewencji post menopauzalnej osteoporozy stanowią niewątpliwą atut kwasu 2-oksoglutarynego i mogą być wzięte pod uwagę w praktyce klinicznej.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu z działaniem 2-Ox w okresie postnatalnym skłaniały do zastanowienia się nad wpływem kwasu 2-oksoglutarynego na rozwój szkieletu w okresie dojrzewania.

Zjawisko wzrostu, rozbudowy i dojrzewania szkieletu nie przebiega jednostajnie. Można wyróżnić okresy przyspieszonego i spowolnionego wzrostu. Jednym z okresów przyspieszenia wzrostu i dużych zmian w obrębie szkieletu jest etap dojrzewania. W przytoczonym powyżej doświadczeniu (b.4) 2-Ox wyraźnie stymulował wzrost chrząstki u zwierząt opóźnionych rozwojowo. Zastanawiającym było zatem czy u zwierząt rozwijających się prawidłowo kwas 2-oksoglutaryny będzie dodatkowym stymulatorem wzrostu szkieletu. W związku z tym przeprowadzono doświadczenie (b.3) na 7-tygodniowych szczurach, którym podawano 2-Ox drogą pokarmową przez 7 tygodni. Wzrost szkieletu u tych zwierząt jest trójfazowy i obejmuje okres przyspieszonego wzrostu między 1 a 5 tygodniem życia, po czym spowalnia aż do osiągnięcia dojrzałości tj. pomiędzy 11 a 13 tygodniem, i następnie jest kontynuowany w spowolnionym tempie do 26 tygodnia, kiedy to praktycznie ustaje.

Ponadto gryzonie charakteryzują się brakiem całkowitego zaniku płytki wzrostowej w kościach długich, a jej pełną aktywność można obserwować jeszcze w 13-14 tygodniu życia. Zatem dodatkowym celem doświadczenia było zbadanie wpływu 2-Ox na szkielet w okresie spadku intensywności wzrostu.

Suplementacja kwasem 2-oksoglutarynym przyspieszyła tempo wzrostu masy ciała, nie wpłynęła natomiast na bezwzględną masę kości długich, ale zwiększyła długość kości udowej i jej gęstość mineralną. Największe zmiany zaobserwowano w tkance chrzęstnej, gdzie 2-Ox zwiększył całkowitą grubość chrząstki wzrostowej, szczególnie w warstwach spoczynkowej i mineralizacji, oraz radykalnie zwiększył grubość chrząstki stawowej, wszystkich trzech warstw. Ponadto u szczurów otrzymujących 2-Ox odnotowano wzrost intensywności autofluorescencji macierzy chrząstki stawowej, co świadczyło o wzroście ilości kolagenu. Nie zauważono natomiast zmian w ilości grup izogenicznych oraz chondrocytów. Z drugiej strony 2-Ox spowodował spadek grubości beleczek kostnych i objętość kości beleczkowej, oraz zwiększył intensywność autofluorescencji beleczek kostnych. Można zatem stwierdzić, że kwas 2-oksoglutaryny wpływał w zdecydowanie większym stopniu na chrząstkę niż na kość. Pomimo przyspieszenia tempa wzrostu masy ciała 2-Ox nie zmienił znacząco rozwoju kości, chociaż zdecydowanie stymulował chrząstkę wzrostową i stawową.

Biorąc pod uwagę doniesienia o zastosowaniu glutaminy i glutamianu w iniekcjach dostawowych w celu hamowania progresji objawów reumatoidalnego zapalenia stawów, zarazem słabą

stabilność glutaminy w roztworach wodnych oraz wyniki przedstawionych powyżej badań, 2-Ox może stanowić alternatywę w tego typu terapiach. Reumatoidalne zapalenie stawów i jego liczne odmiany są coraz częściej diagnozowane u osób młodych w okresie dojrzewania a nawet u dzieci. Wyniki przedstawionych badań nad zastosowaniem kwasu 2-oksoglutarynowego u młodocianych zwierząt mogą stać się przyczynkiem do badań nad dodatkowymi opcjami wspierania terapii stanów zapalnych w obrębie stawów, zwłaszcza u osób młodych, u których nie zakończył się rozwój szkieletu.

Innym obszarem gdzie badano możliwość zastosowania kwasu 2-oksoglutarynowego były zaburzenia mineralizacji kości i struktury chrząstki wywoływane przez interwencje farmakologiczne lub chirurgiczne w obrębie układu pokarmowego (przedstawione w podpunktach b.2, b.5). W badaniach skupiono się na skutkach ubocznych operacji bariatrycznych, związanych z leczeniem skrajnej otyłości, oraz wykorzystania inhibitorów pompy protonowej w zaburzeniach przełykowo-żołądkowo-jelitowych. Pacjenci dotknięci tymi dwiema grupami chorób cywilizacyjnych stanowią ogromną, stale rosnącą grupę przewlekle chorych ludzi, leczonych niejednokrotnie w bardzo długich okresach czasu. Leczenie to niesie za sobą długofalowe efekty uboczne, niejednokrotnie związane z powstaniem nowych, ubocznych schorzeń w tym osteopenii i osteoporoz. Co gorsza, dużą grupę pacjentów dotkniętych otyłością, refluksem żołądkowo-przełykowym czy kraniowo-przełykowym, chorobą wrzodową, zespołem Zöllingera-Ellisona lub idiopatyczną nadwrażliwością są ludzie młodzi już w okresie dojrzewania.

Przeprowadzono zatem dwa eksperymenty na młodych szczurach laboratoryjnych w okresie intensywnego wzrostu kości długich. Podobnie jak w poprzednio opisanych doświadczeniach również za cel postawiono ocenę zmian w obrębie szkieletu wywołanych zastosowaniem z jednej strony omeprazolu, z drugiej gastrektomii. Oba typy leczenia mogą bowiem prowadzić do osteopenii. Zasadnym było zatem zbadanie ewentualnego protekcyjnego wpływu kwasu 2-oksoglutarynowego u zwierząt z osteopenią indukowaną inhibitorem pompy protonowej lub gastrektomią.

W pierwszym doświadczeniu (b.2) młodym siedmiotygodniowym szczurom podawano omeprazol lub omeprazol z kwasem 2-oksoglutarynowym przez siedem tygodni, po czym badano kości długie. Stwierdzono spadek masy badanych kości u zwierząt otrzymujących inhibitor pompy protonowej. Nie odnotowano natomiast zmian w długości kości. Szczury otrzymujące obie badane substancje posiadały krótsze kości piszczelowe. Omeprazol, czego należało się spodziewać, wywołał u zwierząt hipergastrynemię a także znacząco zmniejszył gęstość mineralną oraz parametry geometryczne kości, w szczególności kości udowej. Co ciekawe, zastosowanie omeprazolu spowodowało zmniejszenie sprężystości kości długich bez znaczącego wpływu na pozostałe parametry mechaniczne. Natomiast w przypadku analizy histomorfometrycznej tkanki kostnej nie odnotowano znaczącego wpływu omeprazolu, poza zwiększeniem przestrzeni międzybełczkowej oraz zmniejszeniem ilości osteocytów w przynasadzie piszczeli i zwiększeniem ilości osteocytów w kości udowej. Nie wykazano natomiast zmian w obrębie tkanki chrzęstnej.

Kwas 2-oksoglutarynowy w niewielkim stopniu poprawiał mineralizację, parametry geometryczne i sprężystość kości. Zmniejszał również zmiany w obrębie kości beleczkowej. Ponadto 2-Ox zapobiegał wzrostowi poziomu gastryny u szczurów otrzymujących omeprazol. Kwas 2-oksoglutarynowy okazał się czynnikiem zapobiegającym hipergastrynemii. Wobec doniesień literaturowych podkreślających uboczne skutki długotrwałego stosowania inhibitorów pompy protonowej, obejmujących zaburzenia gospodarki wapnia i jego wchłaniania oraz wtórną nadczynność przytarczyc, substancja regulująca poziom gastryny może być pomocnym uzupełnieniem stosowanej terapii. Dodatkowo kwas 2-oksoglutarynowy wykazał w pewnym stopniu właściwości protekcyjne wobec badanych kości mimo, że doświadczenie przeprowadzono w relatywnie krótkim okresie czasu. Uzyskane wyniki mogą być przyczynkiem do dalszych badań wspomagania terapii inhibitorami pompy protonowej.

W drugim doświadczeniu (b.5), ze względu na znane skutki gastrektomii w obrębie tkanki kostnej (Zał. 4. p. II.A.5) oraz wyniki wskazujące na protekcyjne oddziaływanie 2-Ox na chrząstkę, skupiono się właśnie na tkance chrzęstnej. Chociaż operacje bariatryczne są bardzo efektywną metodą zapobiegania skrajnej otyłości, często ratując życie podobnie jak w przypadku raka żołądka czy powikłanych chorób wrzodowych, to niosą ze sobą długofalowe skutki uboczne. Podobnie jak w poprzednim przypadku (b.2) mogą to być zaburzenia gospodarki wapniowej w organizmie, ale również zaburzenia metabolizmu i wchłaniania witaminy D, przyspieszony obrót kostny i utrata tkanki kostnej prowadzące do osteoporozy. Dodatkowo, w przeciwieństwie do doniesień na temat wpływu gastrektomii na kości, mało jest informacji odnośnie wpływu tego typu procedur chirurgicznych na tkankę chrzęstną. Biorąc pod uwagę niskie tempo metabolizmu chrząstki i jej regeneracji oraz trudności w jej leczeniu, pomimo ogromnego postępu wiedzy i metod leczenia, wszelkie uszkodzenia i zaburzenia jej struktury mogą prowadzić do choroby zwyrodnieniowej stawów, jednej z najpowszechniejszych chorób układu mięśniowo-szkieletowego. Zatem może dochodzić do paradoksalnej sytuacji, w której operacja mająca zapobiegać immobilizacji organizmu wywołanej zbyt dużą masą ciała, doprowadza w swych konsekwencjach do unieruchomienia i niepełnosprawności w wyniku uszkodzeń w obrębie stawów. Dlatego też wydaje się być bardzo istotne poszukiwanie metod zapobiegania występowania wymienionych skutków ubocznych. W związku z tym, u dziesięcioletnich szczurów indukowano osteopenię przy pomocy zabiegu gastrektomii i podawano kwas 2-oksoglutarynowy drogą pokarmową w ciągu 8 tygodni w celu zbadania zarówno wpływu operacji jak i pooperacyjnej suplementacji 2-Ox na strukturę histologiczną chrząstki wzrostowej i stawowej. Gastrektomia wywołała spadek całkowitej grubości obu ocenianych chrząstek, najbardziej oddziałując na warstwy pośrednią, promieniową i mineralizacji w chrząstce stawowej oraz warstwy proliferacji, hipertroficzną i mineralizacji w chrząstce wzrostowej. Skutki uboczne zastosowanej operacji były silniejsze w obrębie chrząstki stawowej. Chociaż gastrektomia nie miała istotnego wpływu na ilość chondrocytów w obu badanych chrząstkach to zmniejszała wielkość oraz zmieniała kształt komórek. Ponadto zaobserwowano zmiany w ilości i rozmieszczeniu kolagenu w chrząstce stawowej. W warstwach powierzchniowej

i promieniowej stwierdzono zmniejszoną ilość kolagenu drobnowłóknistego, co wskazywało na zaburzenia procesów syntezy tego ważnego białka strukturalnego. Najprawdopodobniej z powodu krótkiego czasu doświadczenia nie zauważono istotnych zmian w ilości i rozkładzie proteoglikanów, co mogło być objawem zmian degeneracyjnych w chrząstce stawowej. Z drugiej strony suplementacja kwasem 2-oksoglutarynowym niemal całkowicie zniwelowała skutki uboczne gastrektomii zwiększając grubość obu chrząstek niemalże do poziomu kontroli, zwiększając ilość chondrocytów, niwelując zmiany kształtu komórek i zabezpieczając syntezę i dystrybucję kolagenu w poszczególnych warstwach chrząstki stawowej. Jednak w porównaniu do poprzednich badań (b.3) zanotowano odmienne działanie 2-Ox na chrząstkę, co mogło by sugerować odmienne działanie tej substancji w przypadku zwierząt zdrowych lub narażonych na różnego typu stres. Prawdopodobnie ze względu na wiele różnych szlaków metabolicznych, w jakich bierze udział kwas 2-oksoglutarynowy istnieje możliwość występowania specyficznych mechanizmów regulacyjnych działania tej substancji. Stąd też postulowany pogląd o odmiennym działaniu 2-Ox w organizmie zdrowym lub w różny sposób dotkniętym chorobą bądź stanem zaburzenia rozwoju. Biorąc pod uwagę funkcję kwasu 2-oksoglutarynowego jako donora energii i stymulatora syntezy kolagenu można wyciągnąć wniosek, że anaboliczna rola badanej substancji może być głównym mechanizmem odpowiedzialnym za jej protekcyjne oddziaływanie w przypadku gastrektomii. Ponieważ operacje bariatryczne są często stosowane w celu redukcji masy ciała u otyłych pacjentów, szczególnie młodych, przedstawione wyniki mogą mieć kliniczne zastosowanie. Niniejsze badania dały okazję do poszerzenia wiedzy o skutkach ubocznych gastrektomii w stosunku do chrząstki szklistej, a równocześnie do określenia możliwych efektów ochronnych suplementacji kwasem 2-oksoglutarynowym. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że gastrektomia znacząco pogarsza właściwości chrząstki szklistej a podawanie kwasu 2-oksoglutarynowego w diecie jest w stanie znacząco zredukować jej skutki uboczne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Przyczynkiem od przeprowadzenia badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym były wyniki licznych doświadczeń, z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych i bodźców stresowych, w których oceniano prenatalny jak i postnatalny wpływ kwasu 2-oksoglutarynowego na układ odpornościowy, szkieletowy i pokarmowy. Ocenianymi czynnikami stresowymi były prenatalna i postnatalna ekspozycja na glikokortykoidy oraz dwie odmiany operacji bariatrycznych: gastrektomia, i fundektomia. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń opublikowano w ośmiu poniżej zestawionych artykułach. Kwas 2-oksoglutarynowy podawany prenatalnie zapobiegał spadkowi masy ciała noworodków świń otrzymujących deksametazon, obniżał on także poziom cholesterolu u loch, podwyższony przez nadmiar glikokortykoidów. Kwas 2-oksoglutarynowy podawany prenatalnie zwiększał poziom lizozymu i białka całkowitego we krwi 14 dniowych prosiąt. Podobnie wykazywał działania ochronne w stosunku do bariery jelitowej i struktury wątroby u prosiąt narażonych na prenatalne oddziaływanie deksametazonu. Wreszcie, zarówno w przypadku gastrektomii jak i fundektomii suplementacja kwasem

2-Oksoglutarym w znaczącym stopniu redukowała objawy osteopenii i osteoporozy w obrębie kości długich i płaskich. Dodatkowo w przypadku fundektomii obserwowano ochronne działanie 2-Ox w stosunku do chrząstki stawowej jak i wzrostowej. Planowana jest kontynuacja przedstawionych badań.

- 1) Śliwa E, Dobrowolski P, Tataro MR, Pierzynowski SG, (2007) Alpha-ketoglutarate partially protects newborns from metabolic changes evoked by chronic maternal exposure to glucocorticoids. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 1(1), 055-059.
- 2) Śliwa E, Dobrowolski P, Siwicki AK, Pierzynowski SG, (2007) Changes of a non-specific defense mechanism in blood serum of piglets induced by prenatal and postnatal administration of α -ketoglutarate. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, 297-301.
- 3) Dobrowolski P, Piersiak T, Surve VV, Kruszewska D, Gawron A, Pacuska P, Håkanson R, Pierzynowski SG (2008) Dietary α -ketoglutarate reduces gastrectomy-evoked loss of calvaria and trabecular bone in female rats. *Scand J Gastroenterol*, 43(5), 551-558.
- 4) Śliwa E, Dobrowolski P, Tataro MR, Piersiak T, Siwicki A, Rokita E, Pierzynowski SG (2009) Alpha-ketoglutarate protects the liver of piglets exposed during prenatal life to chronic excess of dexamethasone from metabolic and structural changes. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93, 192-202.
- 5) Śliwa E, Adaszek Ł, Tataro M, Dobrowolski P (2010) Short- and long-term consequences on biochemical markers after fundectomy in pigs supplemented with 3-hydroxy-3-methylbutyrate and alpha-ketoglutarate. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 123, 397-405.
- 6) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Puzio I (2012) Postnatal administration of 2-oxoglutaric acid improves intestinal barrier affected by prenatal action of dexamethasone in pigs. *Nutrition* 28, 190-196.
- 7) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kostro K, Jakubczak A, Taszkun I, Jaworska-Adamu J, Żmuda A, Rycerz K, Muszyński S (2015) Effect of HMB and 2-Ox administered during pregnancy on bone properties in primiparous and multiparous minks (*Neivison vison*). *Bull Vet Inst Pulawy* 59, 563-568.
- 8) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Prost Ł, Hułas-Stasiak M, Muszyński S, Blicharski T (2016) The effect of supplementation of glutamine precursor on the growth plate, articular cartilage and cancellous bone in fundectomy-induced osteopenic bone. *J Vet Med Sci* 78(4), 563-571.

Inną ważną częścią mojej pracy naukowej był także udział w badaniach tzw. prenatalnego programowania rozwoju. W doświadczeniach skupiano się między innymi na ostatnich tygodniach ciąży, w których układ kostnoszkieletowy podlega intensywnym zmianom. Jako czynnika stresogennego użyto deksametazonu, syntetycznego glikokortykoidu, szeroko stosowanego zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynarii. Lek ten pomimo braku działania mineralokortykosteroidowego i diabetogennego może doprowadzać do osteoporozy polekowej, co było ważnym czynnikiem przemawiającym za wyborem tej substancji. Do doświadczeń wykorzystano dwa modele zwierzęce: świnie domową oraz mysz koleczystą ze względu na relatywnie długie okresy ciąży. Przeprowadzone badania, opublikowane w serii ośmiu artykułów przytoczonych poniżej, wykazały, że nawet najmniejsza ingerencja farmakologiczna upośledzała prawidłowe wykształcenie szkieletu oraz jego funkcjonalną sprawność w następnych okresach rozwoju organizmu. Zarówno prenatalne jak i postnatalne stosowanie deksametazonu niosło za sobą zahamowanie ogólnego wzrostu organizmu, wzrostu i dojrzewania kości, czego objawami były spadki parametrów geometrycznych, mechanicznych i mineralizacji. Istotne pogorszenie właściwości struktury kości obserwowano również w przypadku parametrów histomorfometrycznych kości.

- 1) Śliwa E, Dobrowolski P, (2007) Perinatal programming of skeletal system. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 1(2), 112-118.

- 2) Śliwa E, Dobrowolski P, Piersiak T (2010) Bone development of suckling piglets after prenatal, neonatal or perinatal treatment with dexamethasone. *J Anim Physiol Anim Nutr* 94, 293-306.
- 3) Tomaszewska E, Dobrowolski P (2011) Prenatal glucocorticoids can programme postnatal development. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 5(1), 21-6.
- 4) Tomaszewska E, Dobrowolski P (2012) Maternal glucocorticoid treatment as a model for examining foetal gender-specific effects of the development that influences the bone metabolism of neonatal piglets. *Bull Vet Inst Pulawy* 56, 247-253.
- 5) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Puzio I (2013) Morphological changes of the cartilage and bone in newborn piglets evoked by experimentally induced glucocorticoid excess during pregnancy. *J Anim Physiol Anim Nutr* 98, 785-796.
- 6) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Siwicki A (2012) Maternal treatment with dexamethasone at minimal therapeutic doses inhibits neonatal bone development in gender-dependent manner. *Livestock Science* 146, 175-182.
- 7) Iwaniak P, Dobrowolski P, Tomaszewska E, Hułas-Stasiak M, Tomczyk A, Gawron A (2016) The influence of dexamethasone administered prenatally on cartilage of newborn spiny mouse (*Acomys cahirinus*) offspring. *J Dev Orig Hlth Dis* 7(3), 298-305.
- 8) Hułas-Stasiak M, Dobrowolski P, Tomaszewska E (2016) Prenatally administered dexamethasone impairs folliculogenesis in spiny mouse offspring. *Reprod Fertil Dev* 28, 1038-1048.

Inną gałęzią badań, w które byłem zaangażowany to doświadczenia z prenatalnym stosowaniem suplementacji pokarmowej kwasem β -hydrokso- β -metylomasłowym (HMB) u świni domowej i myszy kolczystej, których wyniki opublikowano w serii 4 poniższych artykułów. Badania wykazały silny anaboliczny efekt prenatalnego podawania HMB na noworodki zarówno świni domowej jak i myszy kolczystej. U gryzoni dodatkowo wykazano wpływ badanej substancji na wygładzenie powierzchni szkliva zębów, co może skutkować zmniejszeniem możliwości adhezji bakterii. Ponadto efekt działania HMB zależał od okresu podawania. Jednakże prawdopodobnie kwas β -hydrokso- β -metylomasłowy podawany prenatalnie może zaburzać kontrole i synchronizację pobudliwości komórek nerwowych. Badania te będą kontynuowane w przyszłości w celu weryfikacji i sprecyzowania pozytywnych jak i negatywnych konsekwencji suplementacji HMB.

- 1) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Hułas-Stasiak M, Tomczyk A (2015) Maternal nutrition with β -hydrokso- β -metylbutyrate as strong determinants of the development of newborn offspring in pigs. *J Neonatal Biol* 4, 183. doi: 10.4172/2167-0897.1000183. (open access)
- 2) Świetlicka I, Muszyński S, Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwaśniewska A, Świetlicki M, Skic A, Gołacki K (2016) Prenatally administered HMB modifies the enamel surface roughness in spiny mice offspring: An atomic force microscopy study. *Arch Oral Biol* 70, 24-31.
- 3) Krawczyk A, Rycerz K, Jaworska-Adamu J, Tomaszewska E, Dobrowolski P (2016) Calretinin expression in hippocampus of mouse offspring from dams treated with β -hydrokso- β -metylbutyrate. *Med Weter*, 72, 423-429.
- 4) Muszyński S, Tomczyk A, Dobrowolski P, Tomaszewska E, Hułas-Stasiak M (2017) Preliminary study of time-dependent influence of maternal nutrition with addition of β -hydrokso- β -metylbutyrate on the body weight and selected organs weight in the new-born spiny mice (*Acomys cahirinus*) offspring. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 19(4) <http://www.ejpau.media.pl/volume19/issue4/art-08.html>.

Następną grupą doświadczeń, w które byłem zaangażowany, można określić jako szeroko pojęte badania nad dodatkami paszowymi oraz procedurami hodowlanymi stosowanymi w chowie trzody chlewnej i drobiu w świetle ich wpływu na rozwój szkieletu i układu pokarmowego. Wyniki badań są zawarte w siedmiu poniższych publikacjach. Stosowane preparaty allicyny i ekstraktu czosnkowego u ciężarnych i karmiących swn zwiększały powierzchnię i poprawiały parametry morfologiczne jelita cienkiego prosiąt w trakcie ich rozwoju. Wielkość obserwowanych efektów zależała od okresów rozwojowych. Oba preparaty wykazały działanie stymulujące rozwój w dużym stopniu poprzez swoje antybakteryjne i immunostymulujące właściwości. Komplementarne wyniki osiągnięto przy

zastosowaniu obu preparatów u prosiąt. Z kolei stres wywołany odsadzeniem, badany w kolejnym eksperymencie, uwidoczniał mechanizm regulacji wzrostu organizmu zależny od poziomu aminokwasów we krwi, czego dowodził brak istotnych zmian w poziomach hormonów regulujących procesy wzrostu. Niezamierzony okres głodzenia związany ze zmianą typu pokarmu może wpływać na przyrost masy ciała poprzez zmiany poziomu aminokwasów we krwi. Z kolei w następnych doświadczeniach zwrócono uwagę na wpływ dodatków paszowych na właściwości szkieletu zwierząt hodowlanych. Zastosowanie bentonitu, substancji o silnych właściwościach absorpcyjnych, zapobiegało mykotoksyczności deoksynivalenolu, objawiającej się wystąpieniem objawów osteopenii w kościach długich nerek. Stwierdzono, także, że suplementacja probiotykami diety hodowlanych indyków może wywierać, zależny od dawki, pozytywny wpływ na rozwój kośćca tych zwierząt. Ponadto badano wpływ zabiegu kapłonowania na właściwości szkieletu u dwóch rodzimych ras kur: polbarów i zielononózki. Zabieg kastracji ma w praktyce hodowlanej zwiększać tempo przyrostu masy ciała, jednocześnie polepszając walory smakowe mięsa. Pomimo osiągnięcia zakładanego wyższego tempa wzrostu masy ciała, zabieg upośledzał rozwój kości długich w zakresie geometrii, mechaniki i mineralizacji, czyniąc je bardziej podatne na trwałe deformacje ze względu na spadek elastyczności.

- 1) Tataro MR, Śliwa E, Dudek K, Kowalik S, Gawron A, Piersiak T, Dobrowolski P, Studziński T, (2005) Effect of aged garlic extract and allicin administration to sows during pregnancy and lactation on body weight gain and gastrointestinal tract development of piglets: Morphological properties of the small intestine. Part II. Bull Vet Inst Pulawy 49, 455-464.
- 2) Tataro MR, Śliwa E, Dudek K, Gawron A, Piersiak T, Dobrowolski P, Mosiewicz J, Siwicki AK, Studziński T (2008) Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. Ann Agric Environ Med 15, 63-69.
- 3) Dobrowolski P, Śliwa E (2008) The weaning-related changes in amino acids status of blood plasma in piglets. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 2(1), 071-074.
- 4) Tomaszewska E, Muszyński S, Dobrowolski P, Kostro K, Taszkun I, Żmuda A, Blicharski T, Kędzia P (2016) Bentonite diminishes DON-induced changes in bone development in mink dams. J Vet Res 60, 349-355.
- 5) Tomaszewska E, Kwiecień M, Dobrowolski P, Klebaniuk R, Muszyński S, Olcha M, Blicharski T, Grela E (2016) Dose-dependent effects of probiotic supplementation on bone characteristic and mineralization in meat-type female turkeys. Anim Prod Sci, DOI: 10.1071/AN16289.
- 6) Tomaszewska E, Kwiecień M, Muszyński S, Dobrowolski P, Kasperek K, Blicharski T, Jeżewska-Witkowska G, Grela ER (2017) Long-bone properties and development are affected by caponisation and breed in Polish fowls. Brit Poultry Sci DOI: 10.1080/00071668.2017.1280770.
- 7) Muszyński S, Kwiecień M, Tomaszewska E, Świetlicka I, Dobrowolski P, Kasperek K, Jeżewska-Witkowska G (2017) Effect of caponization on performance and quality characteristics of long bones in Polbar chickens. Poultry Sci 96, 491-500.

W swojej pracy naukowej zaangażowałam się także w badania wpływu suplementacji różnymi postaciami miedzi i cynku na strukturę wybranych organów układu pokarmowego oraz szkieletowego. Wpływ miedzi oceniano z wykorzystaniem modelu szczura laboratoryjnego w różnych okresach rozwojowych, natomiast cynk badano na broilerach kury domowej. Badano między innymi wpływ różnych ilości chelatów aminokwasowych miedzi, w porównaniu do formy nieorganicznej, na parametry biochemiczne i strukturę histologiczną wątroby oraz jelita cienkiego dojrzewających szczurów. Większa biodostępność miedzi w postaci organicznej może powodować objawy toksyczności tego mikroelementu w porównaniu do ilościowo jednakowych dawek soli miedzi. Okazało się, że zawartość chelatów w paszy, odpowiadająca 25% dziennego zapotrzebowania na miedź w postaci

nieorganicznej, pokrywała dzienne zapotrzebowanie dojrzewających szczurów na ten mikroelement, jednocześnie wywierając najmniejsze zmiany w strukturze wątroby. Z kolei 50 i 75% równoważnik miedzi nieorganicznej nie wywierał wpływu na strukturę jelita cienkiego u młodych szczurów. Z drugiej strony osobniki dojrzałe wykazywały wyższą tolerancję, gdyż już zawartość chelatów odpowiadająca 75% dziennego zapotrzebowania na miedź wywierała najmniejsze zmiany w strukturze wątroby i jelita cienkiego. Taka sama dawka chelatów miedzi okazała się najbardziej efektywna w przypadku oceny jej wpływu na kości dojrzałych szczurów, gdzie zaobserwowano poprawę wytrzymałości mechanicznej, zwiększoną objętość kości beleczkowej i wzrost grubości chrząstki stawowej oraz zawartości proteoglikanów. W innym doświadczeniu na dojrzewających szczurach badano preparat miedzi w postaci nanocząstek porównując go do węgla miedzi, standardowo stosowanego w paszach dla gryzoni. Preparat nanomiedzi zwiększał mechaniczną wytrzymałość kości badanych zwierząt w porównaniu do soli węglanowej. Innym badanym mikroelementem był cynk podawany broilerom w formie chelatu aminokwasowego lub tlenku cynku. Podobnie jak w przypadku miedzi skupiono się na zbadaniu wpływu równoważników dziennego zapotrzebowania na rozwój i właściwości mechaniczne, geometryczne i histologiczne kości. Suplementacja przy pomocy chelatów cynku, odpowiadająca 25% dziennego zapotrzebowania na ten mikroelement okazała się niewystarczająca dla poprawnego rozwoju piszczeli, na co wskazywała analiza struktury histologicznej, chociaż z drugiej strony nie zaburzyła wzrostu broilerów, ani parametrów mechaniki i geometrii badanej kości. Poprawę parametrów zwłaszcza mechanicznych uzyskano dla równoważnika 50% dziennego zapotrzebowania na cynk, niezależnie od formy podawania pierwiastka. Jednak i w tym przypadku obserwowano negatywne zmiany struktury histologicznej kości beleczkowej zwłaszcza w obrębie piszczeli. Zatem w przypadku cynku niezależnie od formy jego podawania rekomendowana jest pełna 100% dawka dziennego zapotrzebowania dla w pełni prawidłowego rozwoju szkieletu broilerów.

- 1) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwiecień M, Burmańczuk N, Badzian B, Szymańczyk S, Kurlak P (2014) Alterations of liver histomorphology in relation to copper supplementation in inorganic and organic form in growing rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 58, 479-486.
- 2) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwiecień M (2016) Intestinal alterations, basal hematology, and biochemical parameters in adolescent rats fed different sources of dietary copper. *Biol Trace Elem Res* 171, 185-191.
- 3) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwiecień M, Winiarska-Mieczan A, Tomczyk A, Muszyński S (2016) The influence of the dietary Cu-glycine complex on the histomorphology of cancellous bone, articular cartilage, and growth plate as well as bone mechanical and geometric parameters is dose dependent. *Biol Trace Elem Res* DOI 10.1007/s12011-016-0894-x.
- 4) Tomaszewska E, Muszyński S, Ognik K, Dobrowolski P, Kwiecień M, Juskiewicz J, Chocyk D, Świetlicki M, Blicharski T, Gładyszewska B (2017) Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles with copper (II) salt on bone geometric and structural parameters as well as material characteristics in a rat model. *J Trace Elem Med Bio.* 42, 103-110.
- 5) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwiecień M (2017) Alterations in intestinal and liver histomorphology, and basal hematological and biochemical parameters in relation to different sources of dietary copper in adult rats. *Ann Anim Sci* 17, 477-490.
- 6) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Kwiecień M, Wawrzyniak A, Burmańczuk N (2016) Comparison of the effect of a standard inclusion level of inorganic zinc to organic form at lowered level on bone development in growing male Ross broiler chickens. *Annals of Animal Science* 16, 507-519.
- 7) Tomaszewska E, Muszyński S, Dobrowolski P, Kwiecień M, Winiarska-Mieczan A, Świetlicka I, Wawrzyniak A (2017) Effect of zinc level and source on bone mechanical and geometric parameters, and histomorphology in male broiler chicken. *Braz J Poultry Sci* 19, 159-170.

Innym polem moich zainteresowań naukowych jest akryloamid, substancja powszechnie występująca w wysoko przetworzonej żywności, zarazem wykazująca właściwości neurotoksyczne, genotoksyczne i kancerogenne. W swojej rozprawie doktorskiej pt.: „Preparat włókna ziemniaczanego – Povex a oddziaływanie akryloamidu na jelito cienkie”, której część wyników została opublikowana w przytoczonej poniżej pracy (p.1), próbowałem wskazać jakie zmiany w strukturze jelita cienkiego może wywoływać pokarmowa ekspozycja na akryloamid i czy zastosowanie preparatu włókna ziemniaczanego mogło im przeciwdziałać. W eksperymencie przeprowadzonym na myszach laboratoryjnych akryloamid wywoływał spadek powierzchni wchłaniania, zaburzał proporcje mięśniówki jelitowej, obniżał tempo odnowy nabłonka oraz uszkadzał zwoje splotów Auerbacha i Meissnera. Z drugiej strony stosowane preparaty włókna ziemniaczanego wykazały działanie protekcyjne, gdyż istotnie zmniejszały wpływ akryloamidu na ścianę jelita. Wyniki późniejszych badań, przeprowadzonych na ciężarnych świnkach morskich, wykazały silne prenatalne oddziaływanie akryloamidu zaburzające prawidłowy rozwój zarówno układu pokarmowego jak i płciowego u potomstwa. Wyniki powyższych doświadczeń zostały także podsumowane i obszernie dyskutowane w monografii wymienionej poniżej (p.4).


- 1) Dobrowolski P, Huet P, Karlsson P, Eriksson S, Tomaszewska E, Gawron A, Pierzynowski SG (2012) Potato fibre protects the small intestine wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition* 28, 428-35.
- 2) Hulas-Stasiak M, Dobrowolski P, Tomaszewska E, Kostro K (2013) Maternal acrylamide treatment reduces ovarian follicle number in newborn guinea pig offspring. *Reprod Toxicol* 42, 125-131.
- 3) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Puzio I, Prost L, Kurlak P, Sawczuk P, Badzian B, Hulas-Stasiak M, Kostro K (2014) Acrylamide-induced prenatal programming of intestine structure in guinea pig. *J Physiol Pharmacol* 65(1) 107-115.
- 4) Hulas-Stasiak M, Dobrowolski P, Tomaszewska E (2016) Maternal Acrylamide and Effects on Offspring. - *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 1st Edition, edited by Vural Gökmen Amsterdam, Academic Press, Elsevier Inc. 93-105, ISBN: 978-0-12-802832-2.

Ostatnim obszarem moich zainteresowań naukowych były badania wpływu kadmu i ołowiu na układ szkieletowy i pokarmowy oraz próby poszukiwania substancji niwelujących działanie tych metali ciężkich. Przeprowadzono serię doświadczeń na dorastających i dojrzałych szczurach laboratoryjnych z wykorzystaniem wymienionych metali ciężkich i ekstraktów różnych odmian herbaty lub kwasu taninowego. Wykazano efekty toksyczności zarówno kadmu jak i ołowiu odzwierciedlone w strukturze jelit, wątroby oraz strukturze histologicznej kości beleczkowej oraz właściwościach mechanicznych i geometrycznych kości długich. Ponadto ekspozycja na badane metale ciężkie powodowała spadek gęstości mineralnej kości młodszych zwierząt. Protekcyjny wpływ badanych odmian herbaty był niewielki u dorastających szczurów lub w ogóle nie obserwowany u zwierząt dorosłych. Z drugiej strony kwas taninowy wykazał efekt protekcyjny, zależny od stosowanej dawki, w stosunku do części badanych parametrów kości, najsilniej oddziałując na chrząstkę stawową, gdzie zahamował spadek jej grubości.

- 1) Tomaszewska E, Winiarska-Mieczan A, Dobrowolski P (2015) Hematological and serum biochemical parameters of blood in adolescent rats and histomorphological changes in the jejunal epithelium and liver after chronic exposure to

cadmium and lead in the case of supplementation with green tea vs black, red or white tea. *Exp Toxicol Pathol* 67, 331-339.

- 2) Tomaszewska E, Winiarska-Mieczan A, Dobrowolski P (2015) The lack of protective effects of tea supplementation on liver and jejunal epithelium in adult rats exposed to cadmium and lead. *Environ Toxicol Phar* 40(3), 708-714.
- 3) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M, Tomczyk A, Muszyński S, Radzki R (2016) Alteration in bone geometric and mechanical properties, histomorphometrical parameters of trabecular bone, articular cartilage and growth plate in adolescent rats after chronic co-exposure to cadmium and lead in the case of supplementation with green, black, red and white tea. *Environ Toxicol Phar* 46, 36-44.
- 4) Tomaszewska E, Dobrowolski P, Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M, Tomczyk A, Muszyński S (2017) The effect of tannic acid on the bone tissue of adult male Wistar rats exposed to cadmium and lead. *Exp Toxicol Pathol* 69, 131-141.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized, illegible name.