

AUTOREFERAT

Przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy i osiągnięcia naukowe zgłaszane, jako przedmiot postępowania habilitacyjnego

dr Tomasz Skrzypek

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Elektronowej
Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku

Lublin 2018

Tomasz Skrzypek

Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Elektronowej
Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin
tel. 814454643, 607755673
e-mail: tskrzypek@kul.pl

Spis treści

1. Imię i Nazwisko	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
2.1. Stopień magistra.....	4
2.2. Stopień doktora.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
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).....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	5
5. Omówienie celu naukowego prezentowanych prac	7
5.1. Szczegółowe omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników przedstawionych, jako osiągnięcie naukowe.....	14
5.1.1. Skrzypek, T., Valverde Piedra, J. L., Kazimierczak, W., Szymańczyk, S. E., Zabielski, R., 2010. Changes in pig small intestinal absorptive area during the first 14 days of life. <i>Livestock Science</i> 133, s. 53-56, doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.023.....	14
5.1.2. Ferenc, K., Pilżys, T., Skrzypek, T., Garbicz, D., Marcinkowski, M., Dylewska, M., Gładysz, P., Skorobogatov, O., Gajewski, Z., Grzesiuk, E., Zabielski, R., 2017. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. <i>Disease Markers</i> , article ID: 5238134, doi: 10.1155/2017/5238134.....	15
5.1.3. Skrzypek, T., Godlewski, M. M., Zabielski, R. Rozwój układu pokarmowego. W: <i>Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii</i> . (Red.) W. Skrzypczak, T. Stefaniak, R. Zabielski. PWRiL, Warszawa, 2011, s. 33-86.....	17
5.1.4. Skrzypek, T., Kazimierczak, W., Skrzypek, H., Valverde Piedra, J.L., Godlewski, M.M., Zabielski, R., 2018. Mechanisms involved in the development of the small intestine mucosal layer in postnatal piglets. <i>Journal of Physiology and Pharmacology</i> 69(1), s. 127-138, doi: 10.26402/jpp.2018.1.14.....	18

5.1.5. Skrzypek, T., Kazimierczak, W., 2018. A simplified method of preparation of mammalian intestine samples for scanning electron microscopy, <i>Microscopy Research and Technique</i> s. 1-7, doi: 10.1002/jemt.23141.....	19
5.1.6. Skrzypek, T., Szymańczyk, S., Ferenc, K., Kazimierczak, W., Szczepaniak, K., Zabielski, R. 2018. The contribution of vacuolated foetal-type enterocytes in the process of the small intestine maturation in piglets. <i>Journal of Animal and Feed Science</i> 27(3), s. 187-201, doi: 10.22358/jafs/94167.	19
5. 2. Najistotniejsze osiągnięcia opisane w cyklu prac.	20
5. 3. Zastosowania naukowe i aplikacyjne przedstawionych prac.	21
6. Pozostałe zainteresowania naukowo badawcze.	21
7. Perspektywy badawcze.	24
8. Podsumowanie dorobku i dane bibliometryczne.	25
8.1. Publikacje	25
8.2. Punkty uzyskane za publikacje z listy A.....	25
8.3. Punkty uzyskane za publikacje z listy B i monografie.....	25
8.4. Cytowania i indeks Hirscha (na dzień 18.09.2018).....	25

1. Imię i Nazwisko

Tomasz Skrzypek

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

2.1. Stopień magistra.

Uzyskanie stopnia magistra, Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, specjalność: biologia ogólna, Lublin, 2002.

Praca dyplomowa pt. „Metody izolacji komórek hemolimfy *Galleria mellonella*” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. T. Jakubowicz w Zakładzie Immunologii Bezkręgowców.

2.2. Stopień doktora.

Uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Lublin, 2008.

Praca doktorska pt. „Rozwój struktury błony śluzowej jelita cienkiego *Sus strofa domestica* we wczesnym okresie życia”. Promotor w przewodzie doktorskim: dr hab. Jose Valverde Piedra, recenzenci: prof. dr hab. Artur Dembiński i prof. dr hab. Antoni Gawron.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2013-obecnie	adiunkt naukowy, kierownik Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Elektronowej, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
2010-2013	adiunkt naukowy, Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy (od 2013 r. Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku), Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
2005-2010	asystent naukowo-techniczny (następnie starszy specjalista), Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
2002-2005	starszy technik, Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza, Lublin
2002-2004	wolontariusz, Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski

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

Rozwój jelita cienkiego prosiąt we wczesnym okresie postnatalnym

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 publikacji, 4 oryginalnych publikacji naukowych, jednej pracy przeglądowej oraz rozdziału w podręczniku akademickim.

Sumaryczny pięcioletni Impact Factor (IF) dla w/w publikacji wynosi 8, 939. IF podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi 4, 244 (3 publikacje ukazały się w 2018 roku).

Suma punktów MNiSW zgodnie z aktualnym, ujednoliconym, wykazem czasopism punktowanych z roku 2018 wynosi 155 punktów, wg wykazów z roku opublikowania wynosi 147 punktów.

Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były w części finansowane ze środków uzyskanych w ramach badań własnych i statutowych, początkowo w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry Zoologii i Ekologii KUL, następnie w Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Elektronowej KUL Jana Pawła II. W pracach badawczych częściowo korzystano z aparatury laboratoryjnej zakupionej w ramach programu „Budowa i wyposażenie Interdyscyplinarnego Centrum Badań Naukowych KUL”, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013. Część prac przeprowadzona została w Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Ultrastruktury Wydziału Biotechnologii i Nauk o Środowisku KUL.

Cykl publikacji z lat 2010 – 2018 (IF_{5-letni} = 8, 939, MNiSW₂₀₁₈ = 155)

1. **Skrzypek, T.**✉, Valverde Piedra, J. L., Kazimierczak, W., Szymańczyk, S. E., Zabielski, R., 2010. Changes in pig small intestinal absorptive area during the first 14 days of life. *Livestock Science* 133, s. 53-56, doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.023. **IF_{5-letni}=1,553, MNiSW₂₀₁₈=35**

Indywidualny wkład w publikację - 60%: opracowanie koncepcji badań, pobieranie materiału do analiz mikroskopowych, preparatyka (przygotowanie materiału zwierzęcego do obserwacji w SEM), analiza zmian, pomiary histometryczne, opracowanie metody szacowania powierzchni chłonnej jelita cienkiego w oparciu o pomiary morfometryczne, przygotowanie manuskryptu oraz odpowiedzi recenzentom.

2. Ferenc, K., Pilżys, T., **Skrzypek, T.**, Garbicz, D., Marcinkowski, M., Dylewska, M., Gładysz, P., Skorobogatov, O., Gajewski, Z., Grzesiuk, E., Zabielski, R.✉ 2017. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Disease Markers*, Article ID 5238134, doi: 10.1155/2017/5238134. **IF_{5-letni}=2,742, MNiSW₂₀₁₈= 25**

Indywidualny wkład w publikację – 12%: pobieranie prób do analizy w SEM, preparatyka, analiza próbek w SEM, wykonanie i opracowanie graficzne rycin do artykułu, interpretacja wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.

3. **Skrzypek, T.✉**, Godlewski, M. M., Zabielski, R. Rozwój układu pokarmowego. W: Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii (Red.) W. Skrzypczak, T. Stefaniak, R. Zabielski, PWRiL, Warszawa, 2011, s. 33-86. **MNiSW₁= 30.**

Indywidualny wkład w publikację - 70%: opracowanie i przygotowanie rozdziału, wykonanie i opracowanie mikrofotografii z mikroskopu elektronowego, które zostały użyte w rozdziale podręcznika. Informacje zamieszone w rozdziale podręcznika pochodzą z badań własnych prowadzonych przez autorów.

4. **Skrzypek, T.✉**, Kazimierczak, W., Skrzypek, H., Valverde Piedra, J. L., Godlewski, M. M., Zabielski, R. 2018. Mechanisms involved in the development of the small intestine mucosal layer in postnatal piglets. *Journal of Physiology and Pharmacology* 69 (1), s. 127-138, doi: 10.26402/jpp.2018.1.14. **IF_{5-letni}=2,653, MNiSW=25.**

Indywidualny wkład w publikację - 60%: opracowanie koncepcji badań, kierowanie badaniami, pobieranie materiału zwierzęcego, preparatyka, analiza mikroskopowa, opracowanie wyników, interpretacja wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi recenzentom.

5. **Skrzypek, T.✉**, Kazimierczak, W. 2018. A simplified method of preparation of mammalian intestine samples for scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* s. 1-7, doi: 10.1002/jemt.23141. **IF₂=1,134, MNiSW=20.**

Indywidualny wkład w publikację - 80%: opracowanie zmodyfikowanej metody preparacji tkanek do SEM, udział we wszystkich etapach prac nad optymalizacją metody, przygotowywanie manuskryptu, odpowiedzi recenzentom.

6. **Skrzypek, T.✉**, Szymańczyk, S., Ferenc, K., Kazimierczak, W., Szczepaniak, K., Zabielski, R. 2018. Invited review: The contribution of vacuolated fetal-type enterocytes in the process of the small intestine maturation in piglets. *Journal of Animal and Feed Science* 27(3), s. 187-201, doi: 10.22358/jafs/94167. **IF_{5-letni}=0,857, MNiSW=20.**

Indywidualny wkład w publikację - 60%: opracowanie koncepcji pracy przeglądowej, analiza dostępnej literatury, wykonanie mikrofotografii technikami SEM do pracy, udział w przygotowaniu manuskryptu.

✉ - autor korespondencyjny

MNiSW₁ - podręcznik wyróżniony Nagrodą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 XII 2011

5. Omówienie celu naukowego prezentowanych prac.

Rozwój układu pokarmowego ssaków wykazuje gatunkową specyfikę, jednakże często ulega osobniczym modyfikacjom. W przypadku prosiąt różnice te dostrzegalne są nawet w przypadku zwierząt z jednego miotu. Wywołane są one między innymi przebiegiem ciąży, liczbą płodów, wagą urodzeniową zwierząt, sposobem odżywiania matki, ilością i czasem pobrania siary, dostępnością pokarmu, momentem odsadzenia, czy też zastosowanym na farmie programem żywieniowym. Obecnie udział czynników środowiskowych oddziałujących na rozwój noworodka szacuje się na około 60% (około 40% warunkują czynniki genetyczne). Z tego powodu zrozumienie swoistego programu rozwoju układu pokarmowego prosiąt wymaga dalszych badań (Zabielski, 2006).

Pierwsze godziny po urodzeniu stanowią okres krytyczny, ponieważ noworodek, który pobierał substancje odżywcze przez łożysko musi rozpocząć samodzielne odżywianie. Wraz z przyjściem noworodka na świat, jego układ pokarmowy odpowiada za pobieranie pokarmu, którego skład powinien umożliwić prawidłowy rozwój nie tylko układu pokarmowego, ale całego organizmu. To właśnie czynniki pokarmowe i regulacyjne zawarte w pokarmie matki w największym stopniu oddziałują na strukturę błony śluzowej jelita prosiąt. Pokarm, który przyjmują noworodki: siara i mleko ma nie tylko zapewnić im energię i budulec, ale dzięki obecności składników biologicznie aktywnych (hormonów; czynników wzrostu, adipokin i żołądkowo-jelitowych peptydów regulacyjnych i in.) umożliwić ich prawidłowy rozwój (Zabielski, 2007).

Badania jednoznacznie wskazują na to, że najważniejszym czynnikiem wpływającym na rozwój układu pokarmowego, a zwłaszcza reorganizację błony śluzowej jelita cienkiego jest dieta. Wszelkie niekorzystne zmiany w składzie pokarmu, którym karmione są noworodki zaburzają prawidłowy rozwój przewodu pokarmowego i całego organizmu. Zastąpienie pokarmu matczynego, preparatem mleko-zastępczym spowodowało opóźnienie wymiany enterocytów typu płodowego na enterocyty dorosłe, co skutkowało opóźnieniem zamknięcia bariery jelitowej u 7 dniowych prosiąt (Skrzypek i wsp., 2006). Opóźnienie zamknięcia bariery jelitowej, która na krótko po urodzeniu nie wykazuje selektywności w pobieraniu związków wysokocząsteczkowych stanowi wrota do wnikania drobnoustrojów chorobotwórczych. Ponadto, uniemożliwienie pobrania siary, warunkującej odporność bierną noworodków, zawierającej immunoglobuliny IgA, IgG, IgM prowadzi do ich śmierci.

Rozwój układu pokarmowego prosiąt w okresie perinatalnym jest procesem dynamicznym, najbardziej uwidaczniającym się w przebudowie błony śluzowej jelita cienkiego. Grubość błony śluzowej po urodzeniu zwiększa się we wszystkich odcinkach jelita cienkiego, co manifestuje się zmianami w długości i kształcie kosmków oraz głębokości krypt. Zmiany w obrębie błony śluzowej (zwłaszcza związane z długością i szerokością kosmków oraz zmianami ich zagęszczenia) warunkują zmiany powierzchni trawiennej i chłonnej we wczesnym okresie pourodzeniowym i odsadzeniowym. Także procesy fizjologiczne obserwowane u noworodków takie jak trawienie i wchłanianie składników pokarmowych różnią się od obserwowanych u osobników dorosłych (Zabielski, 2007). Wynika to między innymi z niskiej aktywności sekrecyjnej żołądka i trzustki a także obecności populacji enterocytów płodowych, które umożliwiają nieselektywne pobieranie ze światła jelita wysokocząsteczkowych białek (współtworząc mechanizm otwartej bariery jelitowej).

Błona śluzowa jelita cienkiego ssaków w czasie rozwoju postnatalnego stopniowo dojrzewa do pełnienia funkcji trawiennych i absorpcyjnych (Biernat, 2002). Struktura błony śluzowej jelita cienkiego prosiąt podlega dwukrotnie gruntownej przebudowie w okresie perinatalnym.

Po raz pierwszy ma to miejsce w okresie wczesno urodzeniowym (od dnia urodzenia do 7 dnia życia), a po raz drugi w okresie odsadzeniowym.

Noworodek rodzi się z otwartą barierą jelitową. Jest to stan fizjologiczny, polegający na czasowo zwiększonej, nieselektywnej przepuszczalności nabłonka jelitowego. Otwarta bariera jelitowa umożliwia pobieranie dużych, biologicznie aktywnych makromolekuł obecnych w sianie (wysokocząsteczkowych białek, immunoglobulin i polipeptydów siary i mleka biologicznie aktywnych). Makromolekuły te są następnie transportowane ze światła jelita, poprzez enterocyty typu płodowego do krwiobiegu, bez wpływu na ich właściwości biologiczne. U nowo narodzonych prosiąt karmionych siarą, bariera jelitowa jest otwarta przez około 24-48 godzin po urodzeniu. Okres otwarcia bariery jelitowej pokrywa się czasowo z pobieraniem białek siary przez noworodka. Otwarta bariera jelitowa związana jest z obecnością enterocytów typu płodowego, zdolnych do tworzenia wakuol transportowych. Populacja enterocytów płodowych z wakuolami transportowymi, obserwowana była w dniu urodzenia u prosiąt na całej długości jelita cienkiego od dwunastnicy do jelita krętego i stanowiła około 2% populacji enterocytów (Biernat, 2002). Ta unikatowa populacja komórek ma zdolność do pobierania makromolekuł, ich nieselektywnego transportu i transferu makromolekuł do krwi z zachowaniem ich aktywności biologicznej. Baintner (2002) opisał dwa typy wakuol obecnych w populacji enterocytów typu płodowego: wakuole olbrzymie typu transportowego i wakuole olbrzymie typu trawienneego. Wakuole transportowe są zdolne do przemieszczania się w świetle enterocyty i obserwowane są po pierwszym karmieniu siarą. Wakuole tworzące się w części nadjądrowej enterocyty gromadzą w swoim świetle substancje ze światła jelita (pobrane w procesie endocytozy). Następnie przemieszczają się do części podstawnej komórki, gdzie uwalniają swoją zawartość na drodze egzocytozy do przestrzeni międzykomórkowej, skąd trafia ona do naczyń limfatycznych i krwionośnych. W przeciwieństwie do wakuol transportowych, wakuole trawienne nie są zdolne do przemieszczania się. U prosiąt ssących leżą one nad jądrem komórkowym i często zajmują 2/3 objętości enterocyty. W ich świetle gromadzone są pobrane składniki pokarmowe, a przyłączające się do wakuol pęcherzyki lizosomalne uwalniają enzymy, prowadząc do ich rozkładu. Końcowe produkty trawienia, m. in. aminokwasy i cukry proste trafiają do krwi. Ze względu na niedojrzałość układu pokarmowego zadaniem tych wakuol jest czynny udział w trawieniu składników pokarmowych.

We wczesnym okresie postnatalnym ma miejsce wymiana populacji enterocytów płodowych na enterocyty dorosłe (Baintner, 2002; Skrzypek i wsp., 2007, 2018). Wymieniane są także enterocyty zdolne wytwarzać wakuole trawienne, umożliwiające wewnątrzkomórkowe trawienie pobranych substratów. Wydaje się, że zamykanie bariery jelitowej zależy od pobrania przez organizm noworodka „odpowiedniej ilości” biologicznie aktywnych czynników i immunoglobulin obecnych w sianie w określonym czasie (Grognet i Duvaux-Ponter, 1998). Wykazano, że zamykanie bariery jelitowej jest zaburzone u prosiąt, które nie pobrały odpowiedniej ilości czynników aktywnych z siary. Co ciekawe karmienie prosiąt siarą obcogatunkową także prowadzi do zamykania bariery jelitowej (Lecce i Morgan, 1962). U prosiąt otrzymujących preparat mlekozastępczy w porównaniu z prosiętami karmionymi siarą, indeksy mitotyczny i apoptotyczny były istotnie niższe, a odsetek zwakuolizowanych enterocytów wyższy. Świadczy to o opóźnieniu w wymianie komórek nabłonka jelitowego (Biernat, 2002). Tak, więc, przyjmowanie pokarmu jest głównym czynnikiem przyspieszającym zamykanie bariery jelitowej, zaś jego brak opóźnia jej zamykanie. Obserwowane zjawisko jest niekorzystne dla noworodka, gdyż przedłuża okres otwarcia bariery jelitowej ułatwiając w ten sposób wtargnięcie do organizmu czynników o charakterze patogenów lub alergenów (Biernat, 2002; Fujita i wsp., 2007).

Zanikanie wakuol olbrzymich w populacji enterocytów płodowych jest odzwierciedleniem zmian w funkcji absorpcyjnej i trawiennej błony śluzowej jelita cienkiego w rozwoju postnatalnym. Zanikanie zwakuolizowanych enterocytów i związana z tym wymiana populacji enterocytów płodowych na dojrzałe postępuje wzdłuż jelita cienkiego w określonym czasie, charakterystycznym dla poszczególnych gatunków zwierząt. Zanikanie wakuol jest zjawiskiem charakterystycznym i w połączeniu z innymi metodami np. pomiarem indeksu mitotycznego - stanowi czuły morfologiczny wskaźnik dojrzałości śluzówki jelita cienkiego (Biernat, 2002; Skrzypek i wsp., 2007).

Odsadzenie prosiąt od matki, związane ze zmianą pokarmu z płynnego na stały prowadzi do dalszych zmian w architekturze błony śluzowej jelita. Trudno jednoznacznie stwierdzić czy zmiany w strukturze błony śluzowej prosiąt utrzymywanych w warunkach fermowych, przejawiające się w znacznym skróceniu długości kosmków oraz ich kształtu obserwowane są także w procesie naturalnego rozwoju układu pokarmowego u zwierząt wolnożyjących. U zwierząt przebywających w naturalnych warunkach np. dzików nie ma raptownego odsadzenia. Proces zmiany pokarmu z płynnego na stały jest stopniowy. Związane jest to z pobieraniem pokarmu obecnego w środowisku oraz stopniowym zmniejszeniem laktacji u loch. Ta rozłożona w czasie zmiana diety ułatwia tkankom układu pokarmowego adaptację do zmiany pokarmu z płynnego na stały. Zmiany w powierzchni chłonnej u odsadzonych zwierząt zależą od rodzaju pokarmu i jego składu jakościowego. Wyniki nieopublikowanych jeszcze badań własnych wskazują, że proces przebudowy błony śluzowej jelita prosiąt rozpoczyna się wcześniej u prosiąt krzyżówki świni z dzikiem (*Sus scrofa domestica/Sus scrofa*), w porównaniu do prosiąt świni domowej (*Sus scrofa domestica*) (artykuł w recenzji: Skrzypek, T., Szymańczyk, S., Kazimierczak, W., Lis, M., Ferenc, K., Valverde Piedra, J. L., Zabielski, R. Analysis of changes in the structure of the small intestine mucosa in *Sus scrofa domestica/Sus scrofa* (Duroc/Hampshire/wild boar) piglets in the early postnatal period).

Rozpoczynając badania nad wpływem preparatu mleko-zastępczego oraz czynników, które mogłyby stymulować rozwój układu pokarmowego należało na wstępie ustalić, jak przebiega naturalny rozwój układu pokarmowego, co stanowi „normę rozwojową” i jaki jest wzorzec rozwojowy. Mimo, że wcześniejsze badania prowadzone były zgodnie z metodą naukową (tworzono grupy kontrolne), wciąż brakowało całościowego spojrzenia na to jak dzień po dniu rozwija się układ pokarmowy, a zwłaszcza jelito cienkie. W nim, bowiem jakiegokolwiek zmiany np. zmiana diety czy głodzenie wyrażają się bardzo szybko w strukturze błony śluzowej. Nawet krótkotrwały okres (obserwowany w okresie okołodsadzeniowym, kiedy prosięta nie pobierają pokarmu przez kilka-kilkanaście godzin) manifestuje się zmianami w długości i szerokości kosmków pokrywających błonę śluzową jelita cienkiego.

Badania nad rozwojem układu pokarmowego prosiąt, poza aspektem aplikacyjnym w intensywnym chowie trzody chlewnej, okazały się istotne dla lepszego zrozumienia postnatalnego rozwoju jelita u ludzi. Wynika to stąd, że budowa i funkcje układu pokarmowego świń, a zwłaszcza jelita cienkiego, są zbliżone do człowieka (Mickiewicz i wsp., 2010; Kiljańczyk i wsp., 2013). Zastosowanie modelu rozwojowego układu pokarmowego świń w badaniach biomedycznych w odniesieniu do człowieka zyskuje coraz większe uznanie (Guilloteau i wsp., 2010). Należy wyraźnie podkreślić, że z modeli zwierzęcych, na których prowadzone są badania dotyczące zaburzeń w obrębie układu pokarmowego, wpływu leków, suplementów diety czy innych czynników na jego funkcje to wyłącznie obserwacje poczynione na naczelnych i świnich można odnosić do człowieka. Badania z użyciem naczelnych są krytykowane z powodów etycznych. Model świński pozostaje więc modelem z wyboru. Wykorzystywany jest on do badań nad spontanicznymi (w tym patologicznymi) i indukowanymi zmianami obserwowanymi w trakcie rozwoju przewodu pokarmowego. Dobry przykład stanowią tutaj badania nad zrozumieniem przyczyn

powstawania zespołu wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR). Wystąpienie zespołu IUGR u świń można indukować poprzez dietę matki w czasie trwania ciąży.

Badania nad rozwojem układu pokarmowego przyczyniają się także do poprawy dobrostanu zwierząt hodowlanych. W oparciu o uzyskaną wiedzę, możliwe jest tworzenie optymalnych strategii żywieniowych dla zwierząt, zarówno przed odsadzeniem, jak i odsadzonych. Stosowane obecnie metody intensywnego chowu świń w dużych gospodarstwach często opierają się na wprowadzaniu sztucznych programów żywieniowych. W programach tych stosuje się pokarm stały. Zwykle następuje to zbyt wcześnie, gdy błona śluzowa jelita cienkiego nie jest w pełni dojrzała i przygotowana na trawienie i wchłanianie tego typu pokarmu. Prowadzi to do zaburzeń w procesach trawienia, czego konsekwencją mogą być zapalenia jelita, biegunki i upadki zwierząt. Przykładem wykorzystania badań nad rozwojem układu pokarmowego było wprowadzenie na rynek preparatu uzyskiwanego z lektyny fasoli, stosowanego w trakcie odsadzania prosiąt. Zapobiega on zaburzeniom trawiennym i spadkom masy ciała zwierząt (Radberg i wsp., 2002; Pierzynowski i wsp., 2003).

Szereg prowadzonych badań wskazuje na istnienie ścisłej zależności między odżywianiem płodu i noworodka we wczesnym okresie postnatalnym, a właściwym funkcjonowaniem organizmu w dorosłym życiu (Baker, 1999; Mickiewicz i wsp., 2010, 2012; Kiliańczyk i wsp., 2013). Zależność ta dotyczy szczurów, świń, owiec, a także ludzi. W przypadku noworodków świń urodzonych z niską masą urodzeniową, u których zdiagnozowano zespół IUGR rozwój błony śluzowej różni się od obserwowanego u prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową. Zwierzęta urodzone z zespołem IUGR wykazują anomalie w rozwoju błony śluzowej jelita cienkiego, związane m. in. z zanikaniem enterocytów typu płodowego. Okres wymiany tych enterocytów u prosiąt z zespołem IUGR jest istotnie dłuższy niż u prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową. U zwierząt z zespołem wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu występują również problemy z trawieniem i wchłanianiem składników odżywczych (Amdi i wsp., 2013; Ferenc i wsp., 2017). Anomalie te rzutują na późniejsze funkcjonowanie organizmu. U noworodków owiec, świń i ludzi wystąpienie zespołu IUGR istotnie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia szeregu chorób zespołu metabolicznego w życiu dorosłym. Są to m. in. otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca typu 2 (Baker, 1999; Hales i Baker, 2001).

Zjawisko powstania zespołu IUGR nie jest do końca wyjaśnione. Najczęstszą przyczyną tego syndromu jest nieodpowiednio zbilansowana dieta. Jeżeli w czasie trwania ciąży dojdzie do niedożywienia płodu, a zjawisko to zbiegnie się z krytycznym okresem, w którym dochodzi do wdrukowania metabolicznego (imprinting), organizm taki będzie przez całe życie charakteryzował się oszczędnym metabolizmem i w konsekwencji skłonnością do występowania zespołu metabolicznego w wieku dorosłym (Hales i Baker, 2001). Związek między odżywianiem płodu, a ryzykiem zaistnienia problemów metabolicznych został opisany przez Bakera (1999). Obecnie nosi on nazwę prenatalnie uwarunkowanych schorzeń wieku dorosłego (Fetal Origins of Adult Disease, FOAD).

Występowanie zespołu IUGR stanowi również istotny problem w populacji ludzkiej. Dotyczy on 5-8% urodzeń w Polsce. Do badań nad syndromem IUGR używano dotychczas myszy, szczurów i świń morskich. Jednakże z uwagi na odmienny rodzaj przyjmowanego pokarmu, budowa i rozwój układu pokarmowego tych zwierząt różni się od ludzkiego. Natomiast rozwój przewodu pokarmowego świń, zarówno w okresie prenatalnym i postnatalnym, zbliżony jest do ludzkiego. Z tego też względu wyniki uzyskane w badaniach na modelu świńskim dostarczają cennych danych, które można odnosić również do człowieka.

Przemiana materii, fizjologia trawienia i wchłaniania są programowane na różnych etapach życia płodowego. Istnieje jednak możliwość sterowania dalszym rozwojem układu pokarmowego świń w celu minimalizacji negatywnych skutków zespołu IUGR. Efekt taki można uzyskać stosując substancje bioaktywne, czy odpowiednio zbilansowaną dietę w okresie perinatalnym. Problem ten został dokładnie przedstawiony w podręczniku „Sterowanie rozwojem układu pokarmowego u nowonarodzonych ssaków” pod redakcją R. Zabielskiego (PWRiL, Warszawa 2007). Prowadzenie badań podstawowych dotyczących układu pokarmowego wydaje się być niezbędne w celu zrozumienia procesów i mechanizmów naturalnego rozwoju układu pokarmowego.

W cyklu prac prezentowanych jako osiągnięcie naukowe, podjęte zostały wszystkie wspomniane wyżej aspekty rozwoju układu pokarmowego świń. Cztery z nich są pracami oryginalnymi, jedna pracą przeglądową, a jedna rozdziałem podręcznika akademickiego.

Warunkiem koniecznym przeprowadzenia opisanych w pracach badań było opracowanie powtarzalnej metody pobierania i przygotowania próbek do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (scanning electron microscopy, SEM). Techniki oparte o SEM są czasem niedoceniane i z tego względu rzadko stosowane w badaniu zmian zachodzących w strukturze błony śluzowej układu pokarmowego. Wynika to głównie z dużych trudności w prawidłowym przygotowaniu tkanek przewodu pokarmowego do badania w SEM w związku ze skomplikowaną strukturą błony śluzowej jelita i wysokim uwodnieniem tkanek. Konsekwencją powyższego są liczne artefakty uniemożliwiające prawidłową interpretację zmian w obrębie badanych tkanek.

Analiza struktury błony śluzowej jelita cienkiego w skaningowym mikroskopie elektronowym dostarcza wiele cennych informacji. Są one trudne do uzyskania przy zastosowaniu innych technik mikroskopowych. Obserwacje w SEM umożliwiają śledzenie i trójwymiarowe obrazowanie szeregu zmian, zachodzących w strukturze błony śluzowej jelita cienkiego w czasie rozwoju neonatalnego i postnatalnego. Poza obrazowaniem 3D do zalet SEM należy zaliczyć wysoką rozdzielczość oraz duży zakres uzyskiwanych powiększeń. Sprawia to, że możliwe są obserwacje i) zmiany kształtu i wielkości kosmków, ii) występowania bruzd poprzecznych na kosmkach. Możliwe są również i) szacowanie powierzchni trawiennej i chłonnej, ii) obserwacja powierzchni apikalnej poszczególnych typów komórek nabłonka oraz stref złuszczenia komórek na powierzchni kosmków, iii) pomiary wysokości enterocytów i mikrokosmków oraz iv) analiza występowania i zanikania wakuol olbrzymich w czasie rozwoju postnatalnego. Ponadto, żadna ze znanych technik nie pozwala na obserwację tak dużych powierzchni błony śluzowej.

Prace nad metodą pobierania, utrwalania i dalszego przygotowywania próbek błony śluzowej jelita cienkiego do obserwacji w SEM zostały rozpoczęte w 2005 roku. Od tego czasu metoda podlegała dalszym modyfikacjom, w celu udoskonalenia procesów pobierania, płukania, utrwalania, odwadniania i suszenia tkanek. W swojej obecnej formie procedura opisana w artykule: *“A simplified method of preparation of mammalian intestine samples for scanning electron microscopy”* jest metodą sprawdzoną, pozwalającą na poprawne utrwalenie tkanek przewodu pokarmowego kręgowców (gryzoni, kur, gadów, ssaków), a co najważniejsze charakteryzującą się dużą powtarzalnością, bezpieczną, stosunkowo tanią i umożliwiającą pobranie próbek i ich właściwe utrwalenie i transport w warunkach terenowych. Modyfikacje metody znacznie poprawiły, jakość uzyskiwanych obrazów, umożliwiając rzetelniejszą interpretację mikrofotografii.

Zastosowanie zmodyfikowanej metody przygotowania tkanek układu pokarmowego do analizy w SEM umożliwiło zaobserwowanie cech charakterystycznych dla struktury błony śluzowej jelita cienkiego u prosiąt we wczesnym okresie postnatalnym. Już w trakcie prac nad optymalizacją metody okazała się ona pomocna przy próbie szacowania powierzchni chłonnej błony śluzowej jelita cienkiego prosiąt, co zostało opisane w pracy „*Changes in pig small intestinal absorptive area during the first 14 days of life*”.

Oprócz obserwacji przy użyciu mikroskopu skaningowego prowadzono badania w oparciu o klasyczne metody mikroskopowe (barwienie H+E) oraz mikroskopię konfokalną w oparciu o znakowanie struktur komórki za pomocą barwników fluorescencyjnych. Badania prowadzone w oparciu o uzupełniające się techniki mikroskopowe dostarczyły cennych informacji, które umożliwiły zaproponowanie hipotezy, zakładającej kompresję błony śluzowej jelita, która stanowi część strategii rozwojowej układu pokarmowego, ponieważ umożliwia bardzo szybkie zwiększenie powierzchni absorpcyjnej i chłonnej w pierwszych trzech dniach życia noworodka, co opisano w pracy: „*Mechanisms involved in the development of the small intestine mucosal layer in postnatal piglets.*”

Opracowana technika, przyczyniła się także do pierwszego zobrazowania struktury enterocytów płodowych u prosiąt z wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu, umożliwiając obserwację anomalii strukturalnych pojawiających w enterocytach prosiąt urodzonych z syndromem IUGR w odniesieniu do prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową, co opisano w pracy: „*Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates*”.

Wyniki badań podejmowanych w czasie prac nad rozwojem układu pokarmowego ssaków zostały częściowo wykorzystane do napisania rozdziału w podręczniku akademickim: „*Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii*”. Podręcznik ten jest o tyle istotną pozycją wydawniczą na rynku, że jako pierwszy w Polsce traktuje o rozwoju noworodka, wykazując, że noworodek nie jest „mniejszą kopią” osobnika dorosłego, ale organizmem o odmiennej fizjologii w porównaniu do osobników dojrzałych.

W pracy „*The contribution of vacuolated fetal-type enterocytes in the process of the small intestine maturation in piglets*” zostały zawarte najnowsze wiadomości dotyczące udziału enterocytów typu płodowego w dojrzewaniu jelita. Gros informacji zawartych w artykule pochodzi z badań własnych i stanowi przyczynek do zrozumienia procesu rozwoju jelita prosiąt.

Literatura:

- Amdi, C., Krogh, U., Flummer, C., Oksbjerg, N., Hansen, C. F., Theil, P. K. 2013. Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. *Journal of Animal Science*. 91, s. 5605–5613, <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6824>.
- Baintner, K. Vacuolation of the young. W: *Biology of the Intestine in Growing Animals* (Red.) R. Zabielski, P. C. Gregory, B. Weström. Elsevier, Amsterdam, 2002, s. 55-110.
- Barker, D. J. 1999. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 13, s. 807-813.

- Biernat, M. Factors regulating the growth and maturation of the structure and function of the small intestine of the piglets in the early postnatal period. Instytut Fizjologii i Żywienia PAN, Jabłonna, Poland. Rozprawa doktorska, 2002.
- Biernat, M., Woliński, J., Zabielski, R. Rozwój błony śluzowej jelita u nowonarodzonych prosiąt. „Noworodek a środowisko”, (Red.) W. Skrzypczak, T. Stefaniak, R. Zabielski. Wrocław, 2004, s. 39-53.
- Ferenc, K., Pilżys, T., Skrzypek, T. i wsp. 2017. Structure and function of enterocyte in intrauterine growth retarded pig neonates. *Disease Markers* 1-9, <https://doi.org/10.1155/2017/5238134>.
- Fujita, M., Baba, R., Shimamoto, M., Sakuma, Y., Fujimoto, S. 2007. Molecular morphology of the digestive tract; macromolecules and food allergens are transferred intact across the intestinal absorptive cells during the neonatal-suckling period. *Medical Molecular Morphology* 40, s. 1-7, <https://doi.org/10.1007/s00795-006-0346-3>.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski R., Van Immerseel, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews* 23(2), s. 366-384, doi: <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>.
- Grognet, J. F., Duvaux-Ponter, Ch. 1998. Acquisition of passive immunity in domestic ungulates. *Journal of Animal Feed Sciences* 7, s. 93-114, <https://doi.org/10.22358/jafs/69958/1998>.
- Hales, C. N., Baker D. J. 2001. The thirty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60, s. 5-20.
- Kiliańczyk, R., Ferenc, K., Zabielski, R. 2013. Przyczyny i skutki wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu dla dalszego rozwoju organizmu. *Życie Weterynaryjne* 88(9), s. 771-775.
- Lecce, J. G., Morgan, D. O. 1962. Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb. *Journal of Nutrition* 78, s. 263.
- Mickiewicz, M., Pietrzak, P., Kotunia, A., Metges, C. C., Guilloteau P., Zabielski R. 2010. Co wiemy o rozwoju układu pokarmowego u noworodków z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrostu? *Przegląd Gastroenterologiczny* 5 (1), s. 8-14.
- Mickiewicz, M., Zabielski, R., Grenier, B. et al. 2012. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63, s. 225–239.
- Pierzynowski, S.G., Weström, B.R., Zabielski, R., Svendsen J., Studziński T., Valverde Piedra J.L., Kruszewska D., Linderöth A., Biernat M., Rådberg K., Mattsson I., Woliński J., Michałowska E., Pawłowska M., Skrzypek T., Kiela P., Thompson A., Pacuska P. 2003. Nowa strategia zapobiegania problemom odsadzania u prosiąt z użyciem lektyny. *Magazyn Weterynaryjny* (6), s. 43-44.
- Raadberg, K., Biernat, M., Linderöth, A., Zabielski, R., Pierzynowski, S. G., Westrom, B. R. 2001. Enteral exposure to crude red kidney bean lectin induces maturation of the gut in suckling pigs. *Journal of Animal Science* 79, s. 2669-2678.

- Skrzypek, T., Valverde Piedra, J. L., Skrzypek, H., Kazimierczak, W., Biernat, M., Zabielski, R. 2007. Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets. *Journal of Physiology and Pharmacology* 58 (S3), s. 87-95.
- Skrzypek, T., Valverde Piedra, J. L., Skrzypek, H., Kazimierczak, W. S., Woliński, J., Zabielski, R. 2006. Rozwój jelita cienkiego u prosiąt karmionych mlekiem matki i preparatem mlekozastępczym w pierwszym tygodniu życia. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica* 48, s. 67-80.
- Tahir, J.F., Sanglid, P. T. Studying the development of the small intestine: physiological and anatomical perspectives. W: *Biology of the Intestine in Growing Animals*. (Red.) R. Zabielski, P.C. Gregory, B. Weström. Amsterdam, Elsevier, 2002, s. 55-110.
- Zabielski, R. 2007. Hormonal and neural regulation of intestinal function. *Livestock Science* 108, s. 32-40.
- Zabielski, R. 2006. What youth is used to, age remembers...or how much the gastrointestinal functions in animals and human depend on the perinatal development. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica* 48, s. 7-16.
- Zabielski, R. (Red). *Sterowanie rozwojem układu pokarmowego u nowonarodzonych ssaków*. PWRiL, Warszawa 2007.

5.1. Szczegółowe omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników przedstawionych, jako osiągnięcie naukowe.

5.1.1. Skrzypek, T., Valverde Piedra, J. L., Kazimierczak, W., Szymańczyk, S. E., Zabielski, R., 2010. Changes in pig small intestinal absorptive area during the first 14 days of life. *Livestock Science* 133, s. 53-56, doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.023

W pracy podjęto próbę oszacowania powierzchni chłonnej dwunastnicy i środkowego odcinka jelita czczego prosiąt w dniu urodzenia oraz 3, 7 i 14 dnia życia. Do oszacowania powierzchni chłonnej wykorzystano takie parametry jak: gęstość kosmków na jednostkę powierzchni (liczba kosmków na /1 mm²), wysokość i szerokość kosmków. Zmierzono także głębokość krypt oraz grubość błony śluzowej. Analizowano zanikanie bruzd poprzecznych na powierzchni kosmków, których liczba zmniejszała się wraz z wiekiem prosiąt. Analiza parametrów rozwojowych wykazała, że wraz z wiekiem maleje gęstość kosmków na jednostkę powierzchni, co powiązane jest z wydłużaniem i poszerzaniem się jelita podczas wzrostu w okresie pourodzeniowym. Kosmki w momencie urodzenia mają palczasty kształt. Wraz z wiekiem ich kształt zmienia się i często obserwowane są kosmki liściaste. W 14 dniu życia w odcinku dwunastniczym obecne są kosmki o nieregularnych kształtach.

Zanikanie bruzd poprzecznych w dwunastnicy i środkowym odcinku jelita czczego było powiązane z wydłużaniem się kosmków zwłaszcza między dniem urodzenia, a 3 dniem życia. W tym okresie obserwowano także zwiększenie szerokości kosmków i głębokości krypt. W 3 dniu życia prosiąt kosmki w odcinku dwunastniczym i środkowym jelita czczego (wysokość odpowiednio 533±124 μm i 980±124 μm) były ponad 2 razy wyższe niż w dniu urodzenia (252±85 μm; 441±162 μm). Błona śluzowa była najgrubsza w 3 dniu życia w obydwu analizowanych odcinkach. Na podstawie zmierzonych parametrów błony śluzowej oszacowano powierzchnię błony śluzowej jelita. Przyjęto, że pole powierzchni kosmka

odpowiada w przybliżeniu kształtowi walca, tak, więc pole powierzchni kosmka liczono z pola powierzchni walca. Pole powierzchni chłonnej oszacowano podając pola powierzchni kosmków obecnych na 1 mm² powierzchni błony śluzowej jelita. Tak przyjęta metoda oszacowania powierzchni błony śluzowej nie jest dokładna, ale umożliwiła prześledzenie zmian wielkości powierzchni chłonnej błony śluzowej jelita cienkiego w kolejnych dniach życia.

Opierając się wyłącznie na pomiarach morfometrycznych np. długości kosmków wydawać by się mogło, że im dłuższe kosmki tym większa powierzchnia chłonna. Rozumowanie to jest trafne, jednak niepozbawione błędów, ponieważ nie uwzględnia się w nim szerokości kosmków ani ich gęstości, co może się przyczynić do popełnienia błędu w ocenie powierzchni chłonnej. Według zastosowanej metody ewaluacji powierzchni błony śluzowej, zwiększa się ona prawie trzykrotnie pomiędzy dniem urodzenia, a 3 i 7 dniem życia w odcinku dwunastniczym (kolejno: 6,3; 17,1; 17,6), aby w 14 dniu osiągnąć wartość 9,3. Podobnie w odcinku środkowym jelita czczego. W dniu urodzenia szacowana powierzchnia wynosiła 14,2, a w dniach kolejnych: 3, 7, 14, odpowiednio 36,8; 43,3; 14,4. Uzyskane dane wskazują na dynamiczne zwiększenie powierzchni chłonnej jelita w pierwszych 3 i 7 dniu po urodzeniu. W 14 dniu życia następuje zmniejszenie powierzchni chłonnej. W przypadku środkowego odcinka jelita czczego powierzchnia błony śluzowej zbliża się do wartości z obserwowanej tuż po urodzeniu. Obserwacja ta wymaga dalszego wyjaśnienia, ponieważ okres dwóch tygodni wpisuje się w II okres krytyczny obserwowany w okresie postnatalnym u prosiąt (I – ma miejsce od momentu urodzenia do 7 dni po urodzeniu, II od 7 do 21 dnia życia), w którym hodowcy notują dużo upadków zwierząt. Zaobserwowano, tu sytuacje, kiedy pomimo zwiększonej masy ciała (w dniu urodzenia prosięta ważą około 1,5 kg, po pierwszym tygodniu około 3 kg) powierzchnia chłonna jest zbliżona do obserwowanej w momencie urodzenia, co sugeruje, że pomimo, że pokarm jest dostępny nie musi być on efektywnie wykorzystany przez zwierzę.

Proponowana w pracy metoda oceny powierzchni chłonnej błony śluzowej jelita cienkiego umożliwia oszacowanie powierzchni w oparciu o ogólnie stosowane parametry morfometryczne. Uwzględnienie wyłącznie pojedynczych parametrów może prowadzić do błędnej oceny powierzchni błony śluzowej, ponieważ, jeżeli weźmiemy pod uwagę np. długość i szerokości kosmków to pomiędzy 7, a 14 dniem nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic zarówno w dwunastnicy jak i odcinku środkowym jelita czczego, a powierzchnia absorpcyjna uległa znacznemu zmniejszeniu.

5.1.2. Ferenc, K., Pilżys, T., Skrzypek, T., Garbicz, D., Marcinkowski, M., Dylewska, M., Gładysz, P., Skorobogatov, O., Gajewski, Z., Grzesiuk, E., Zabielski, R., 2017. Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Disease Markers*, article ID: 5238134, doi: 10.1155/2017/5238134

Praca miała na celu zbadanie struktury i scharakteryzowanie funkcji trawiennych i absorpcyjnych enterocytów u prosiąt urodzonych z syndromem wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (intrauterine growth retardation, IUGR) w 7 dniu życia. Prosięta IUGR charakteryzuje masa urodzeniowa poniżej 1,1 kg oraz wysoka śmiertelność. Do badań użyto 8 par prosiąt (*S.scrofa domestica*, *Landrace x Pietrain*), każda para pochodziła z innego miotu. Prosięta dobierano losowo, jedno z prosiąt charakteryzowało się normalną wagą pomiędzy 1.3-1.6 kg, waga drugiego była w zakresie 0.6-0.9 kg (osobnik z zespołem IUGR). Prosięta z syndromem IUGR poza niską masą urodzeniową charakteryzują się wydłużonym

tułowiem, zmniejszonym obwodem brzucha i nieproporcjonalnie dużą głową (asymetryczny typ zespołu IUGR). Problem noworodków charakteryzujących się niską masą urodzeniową nie dotyczy tylko prosiąt, w Polsce, co roku około 6% noworodków ludzkich rodzi się z niską masą urodzeniową i cechami, które umożliwiają zakwalifikowanie noworodka, jako IUGR. Ponadto noworodki IUGR opisano nie tylko u ludzi i świń, problem dotyka także gryzoni, królików, cieląt i jagniąt, co ma istotne znaczenie w hodowli.

Układ pokarmowy prosiąt z IUGR charakteryzuje się opóźnionym rozwojem, mniejszą masą, zaburzeniami w motoryce oraz trawieniu i wchłanianiu składników pokarmowych w porównaniu do zwierząt urodzonych z normalną masą urodzeniową. Prosięta z IUGR miały istotnie cieńszą błonę śluzową i mięśniową, a także istotnie zwiększony udział enterocytów typu płodowego w błonie śluzowej. U prosiąt urodzonych z zespołem IUGR stwierdzono szereg anomalii w dojrzewaniu błony śluzowej jelita cienkiego. W pracy „*Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets*” (Skrzypek i wsp., 2007) opisaliśmy wzór zanikania enterocytów typu płodowego u prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową. Zaburzony wzór w zanikaniu enterocytów typu płodowego, zaobserwowany także w naszych badaniach, ujawniły po raz pierwszy badania Mickiewicza i wsp. (2012), którzy wykazali, że dniu urodzenia w jelicie cienkim prosiąt IUGR było około 60-67% zwakuolizowanych enterocytów, podczas, gdy w grupie prosiąt o normalnej masie urodzeniowej zwakuolizowane enterocyty stanowią do 40% enterocytów jelita cienkiego i głównie są zlokalizowane w jelicie biodrowym. Zwiększony udział enterocytów typu płodowego w błonie śluzowej prosiąt IUGR wynika prawdopodobnie z zahamowania apoptozy w obrębie szczytów kosmków, oraz ograniczenia podziałów mitotycznych w obrębie krypt jelitowych.

Obserwacje z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wykazały, że nadjądrowe przestrzenie enterocytów płodowych obecnych u prosiąt IUGR w odcinku końcowym jelita czczego i jelicie biodrowym nie zawierają typowych wakuol olbrzymich, obserwowanych w enterocytach prosiąt urodzonych z normalną wagą. Wakuole te odpowiadają za nieselektywny transfer makromolekuł pobranych ze światła jelita do krwi. W enterocytach płodowych obecnych u prosiąt IUGR w odcinku dystalnym jelita czczego i jelicie biodrowym, część nadjądrowa wyglądała jak gąbczasta struktura pełna małych przestrzeni o średnicy nieprzekraczającej 1 mikrometra, a pozbawiona typowych dla wakuol olbrzymich dużych przestrzeni. Przepuszczalność jelita u nowo narodzonych prosiąt warunkowana jest obecnością w enterocycie płodowym wierzchołkowego systemu kanalikowego (apical canalicular system, ACS), który w naszych badaniach nie był obserwowany u prosiąt IUGR. Transport makromolekuł siary poprzez enterocyty zależy od obecności ACS oraz od zdolności skupiania wypełnionych pęcherzyków w coraz większe struktury prowadząc do tworzenia wakuol transportowych. Tego zjawiska w enterocytach prosiąt IUGR również nie obserwowano. Obserwowane enterocyty typu płodowego u IUGR, przypominają wczesną formę enterocytów typu płodowego obecną w jelicie cienkim płodów prosiąt pod koniec ciąży (Dekaney i wsp., 1997). Można zatem przypuszczać, że u osobników z IUGR proces rozwoju enterocytów płodowych wykazuje ponad tygodniowe opóźnienie, mimo dostępności siary i mleka. Obserwowane zaburzenia w enterocytach płodowych u nowo narodzonych prosiąt (brak ACS i tworzenia wakuol olbrzymich) mogą być przyczyną zaburzeń procesów trawienia i wchłaniania u prosiąt IUGR opisanych wcześniej przez Mickiewicza i wsp. (2012). Podobne wnioski prezentuje Amdí i wsp. (2013) sugerując, że zaburzenia wzrostu u prosiąt z IUGR mogą wynikać nie z niedostatku składników pokarmowych, a raczej z zaburzonego ich pobierania i upośledzonego transferu czynników biologicznie aktywnych ze światła jelita do krwi. Spostrzeżenia te zdają się potwierdzać dane niepublikowane, oparte na obserwacjach, z których wynika, że prosięta z syndromem IUGR,

które padają w okresie pourodzeniowym, często mają pokarm zarówno w żołądku jak i jelitach, co sugeruje problemy z przyswajaniem i transportem pokarmu poprzez błonę śluzową jelita.

Wyniki badań wskazują na zmodyfikowany program rozwoju błony śluzowej prosiąt z IUGR w porównaniu do prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową. Badania sugerują, że rozwój układu pokarmowego u osobników z syndromem IUGR przebiega inaczej niż u osobników urodzonych z normalną masą urodzeniową, zmiany te mogą być przyczyną np. zaburzeń w zamykaniu bariery jelitowej oraz wchłanianiu. Badania na prosiątach z syndromem IUGR stanowią doskonały model badawczy w odniesieniu do ludzi, ze względu na możliwość projekcji badań na człowieka.

Literatura:

Amdi, C., Krogh, U., Flummer, C., Oksbjerg, N., Hansen, C. F., Theil, P. K. 2013. Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. *Journal of Animal Science* 91, s. 5605–5613, <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6824>.

Dekaney C. M., Bazer F. W., Jaeger, L. A. Mucosal morphogenesis and cytodifferentiation in fetal porcine small intestine. 1997. *Anatomical Record* 249, s. 517–523, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199712\)249:4<517::AID-AR12>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199712)249:4<517::AID-AR12>3.0.CO;2-R).

Mickiewicz, M., Zabielski, R., Grenier, B. i wsp. 2012. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63, s. 225–239.

Skrzypek, T., Valverde Piedra, J.L., Skrzypek, H., Kazimierzczak, W., Biernat, M., Zabielski, R. 2007. Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets. *Journal of Physiology and Pharmacology* 58(S3), s. 87-95.

5.1.3. Skrzypek, T., Godlewski, M. M., Zabielski, R. Rozwój układu pokarmowego. W: *Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii*. (Red.) W. Skrzypczak, T. Stefaniak, R. Zabielski. PWRiL, Warszawa, 2011, s. 33-86.

W rozdziale „Rozwój układu pokarmowego” podręcznika akademickiego „Fizjologia Noworodka z elementami patofizjologii” opisano zmiany zachodzących w obrębie przewodu pokarmowego zwierząt w okresie perinatalnym. Od pewnego czasu wskazuje się na bardzo istotne różnice anatomiczne i fizjologiczne pomiędzy noworodkiem a dorosłym osobnikiem. Różnice te są na tyle istotne, że projektowanie obserwacji dokonanych na osobnikach dorosłych na noworodki jest błędem. W podręczniku, który dedykowany jest studentom kierunków biologicznym, weterynaryjnym i medycznym, w rozdziale „Rozwój układu pokarmowego” opisano szczegółowo rozwój morfologiczny i czynnościowy żołądka, funkcje żołądka, motorykę i wydzielanie soku żołądkowego. Szczegółowo opisany został rozwój jelita, ze szczególnym uwzględnieniem okresu prenatalnego i postnatalnego. Dokładnie zostały scharakteryzowane komórki błony śluzowej jelita (dokrewne, Panetha, kępkowe, komórki M), opisano także rozwój motoryki jelita cienkiego, trawienie i wchłanianie jelitowe oraz rozwój mechanizmów regulacji przewodu pokarmowego. Podjęty został także temat rozwoju układu pokarmowego u wcześniaków oraz rozwój układu pokarmowego osobników o niskiej masie urodzeniowej i z wewnątrzmacicznym zaburzeniem rozwoju płodu. Duża

część informacji zawartych w rozdziale pochodzi z długoletnich własnych badań autorów rozdziału. Redaktorzy podręcznika „Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii” zostali nagrodzeni Nagrodą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dnia 12 XII 2011: „za osiągnięcia dydaktyczne za podręcznik Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii”.

5.1.4. Skrzypek, T., Kazimierczak, W., Skrzypek, H., Valverde Piedra, J.L., Godlewski, M.M., Zabielski, R., 2018. Mechanisms involved in the development of the small intestine mucosal layer in postnatal piglets. *Journal of Physiology and Pharmacology* 69(1), s. 127-138, doi: 10.26402/jpp.2018.1.14

W pracy postawiono hipotezę dotyczącą kompresji jelita. Hipoteza ta jest efektem długoletnich badań nad rozwojem jelita cienkiego prosiąt w okresie prenatalnym i postnatalnym. W pracy udowodniono, na podstawie analizy zmian obserwowanych w trakcie rozwoju jelita, że jelito w momencie urodzenia jest przygotowane po podjęcia swoich funkcji. Błona śluzowa jelita jest skompresowana i po pierwszym pobraniu siary, rozpoczyna się dalszy, bardzo dynamiczny rozwój jelita cienkiego.

Rozwój jelita jest zwyczajowo traktowany, jako wypadkowa wzrostu i dojrzewania. Wzrost obejmuje zwiększenie ilości i wielkości komórek nabłonka w przypadku błony śluzowej jelita cienkiego, natomiast dojrzewanie wiąże się ze zmianami trawienia i wchłanianiu substancji odżywczych, a także z procesem wymiany populacji komórek nabłonka. Rozwój jelita we wczesnym okresie pourodzeniowym jest stymulowany poprzez czynniki obecne w sianie i mleku (hormony, peptydy). W literaturze często używa się terminu wzrost wysokości kosmków, co sugeruje, że zmiana wysokości kosmków jest wynikiem podziałów komórek w kryptach.

Na podstawie własnych badań opartych o analizy w SEM oraz inne techniki obrazowania, zaobserwowano na powierzchni kosmków obecność bruzd poprzecznych, wpukleń sięgających 20 μm w głąb kosmka, w których jest zachowana ciągłość nabłonka. Zanikają one w 3 dniu życia, z rzadka obserwowane są w 7 dniu życia, zwłaszcza w odcinku środkowym jelita czczego, gdzie kosmki są najdłuższe (w porównaniu do odcinka dwunastniczego i biodrowego). Liczne bruzdy obecne na kosmkach stanowią rezerwę błony śluzowej, która po rozprostowaniu powoduje zwiększenie długości kosmków. Prosięta rodzą się niejako z „nadmiarem” błony śluzowej, co w pracy określono, jako kompresję. W pracy wprowadzony został ponadto termin „zwiększania”(enlargement) powierzchni błony śluzowej. Termin ten ma sugerować, że powierzchnia błony śluzowej ulega szybkiemu zwiększeniu, co nie jest tożsame z używanym terminem „wzrost”. Pobranie dużej ilości siary przez enterocyty typu płodowego, zdolne do tworzenia wakuol transportowych, a także otwarta (nieselektywna w tym czasie) bariera enterocytarna umożliwia pobranie dużej ilości składników ze światła jelita i ich transport do naczyń kosmka. Wchłonięcie tak dużej ilości składników siary do enterocytów, powoduje zwiększenie ich objętości, (co przejawiało się w zwiększeniu wysokości enterocytów pomiędzy dniem urodzenia, a trzecim dniem życia prosiąt), natomiast transport substancji (białek, elektrolitów i wody) do przestrzeni naczyń kosmka powoduje ich „rozciągnięcie”. Oba wspomniane procesy prowadzą do „zwiększenia” kosmków. Ponadto akceleracja mikrokrążenia w obrębie naczyń błony śluzowej tuż po urodzeniu stymulowana przez produkcję endoteliny i tlenu azotu oraz zwiększenie objętości limfy w kosmkach, prowadzą do efektywniejszego transportu składników siary, zarazem stanowią mechanizm biorący udział w zwiększeniu objętości kosmków.

Współdziałanie opisanych mechanizmów prowadzi do szybkiego zwiększenia powierzchni błony śluzowej i poprzez to, do jeszcze efektywniejszego pobierania składników siary, która obecna jest u miaciory do 2 dni po urodzeniu. Podziały komórek, a więc wzrost jest także istotny, jednakże tuż po urodzeniu to układ pokarmowy odpowiada za odżywienie całego ustroju, dlatego też hipoteza opisująca kompresję jelita wydaje się prawdopodobna. Organizm zamiast inwestować „nakłady i środki” we wzrost błony śluzowej, „przygotowuje” tą strukturę niejako wcześniej, a pobranie siary pociąga za sobą lawinę zmian w błonie śluzowej. Pobranie siary rozpoczyna także proces dojrzewania układu pokarmowego, poprzez jego stymulację obecnymi w niej biologicznie aktywnymi czynnikami (hormony, peptydy).

5.1.5. Skrzypek, T., Kazimierczak, W., 2018. A simplified method of preparation of mammalian intestine samples for scanning electron microscopy, *Microscopy Research and Technique* s. 1-7, doi: 10.1002/jemt.23141

W pracy zaproponowano kompletną, sprawdzoną metodę przygotowania tkanek układu pokarmowego kręgowców, pobieranych w warunkach terenowych do analizy w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM). Metoda charakteryzuje się znakomitą powtarzalnością, jest bezpieczna dla preparatora oraz niedroga. Szczególną uwagę zwrócono na prawidłowe pobieranie próbek w warunkach terenowych, wykazano najczęstsze błędy, których zaistnienie powoduje powstanie artefaktów i eliminuje próbki z dalszej preparatyki. Metoda była z powodzeniem stosowana do analizy struktury błony śluzowej jelita u ssaków, ptaków i gadów. Wylimitowanie z metody kancerogennych utrwalaczy na rzecz zbuforowanej formaliny uczyniło metodę bardziej przyjazną zarówno dla badacza jak i środowiska. W toku wielu lat doświadczeń zaproponowano optymalne parametry, utrwalania, odwadnianie i suszenia w celu uniknięcia zmian mogących uniemożliwić rzetelne obserwacje tkanki. Praca została napisana z myślą o przybliżeniu techniki preparatyki SEM oraz przedyskutowania potencjalnych błędów, które to dyskwalifikują osiągnięte wyniki już w momencie wykonywania mikrofotografii.

5.1.6. Skrzypek, T., Szymańczyk, S., Ferenc, K., Kazimierczak, W., Szczepaniak, K., Zabielski, R. 2018. The contribution of vacuolated foetal-type enterocytes in the process of the small intestine maturation in piglets. *Journal of Animal and Feed Science* 27(3), s. 187-201, doi: 10.22358/jafs/94167.

W pracy na podstawie własnych badań jak i dostępnych wyników literaturowych opisano rolę, jaką pełnią enterocyty typu płodowego w dojrzewaniu jelita cienkiego. Jest to problem wciąż wymagający szerokich badań i niezwykle złożony. Obecność enterocytów typu płodowego w dniu urodzin oraz ich zanik w odpowiednim czasie są niezwykle istotne dla prawidłowego rozwoju jelita noworodka, czego potwierdzeniem jest ich obecność we wczesno postnatalnym okresie rozwojowym u wielu gatunków ssaków, w tym człowieka. Struktura enterocytów płodowych wykazuje duże podobieństwo morfologiczne u wielu gatunków ssaków. Zostało naukowo dowiedzione, że modyfikacje struktury enterocytów płodowych obserwowane u osobników z syndromem wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR), mogą skutkować zaburzeniami rozwoju nabłonka jelitowego, a także upośledzać wchłanianie i transport substancji odżywczych. (Mickiewicz i wsp., 2012; Amdi wsp., 2013)

Unikatowa populacja komórek, jaką są enterocyty typu płodowego ma zdolność do pobierania makromolekuł oraz nieselektywnego ich transportu/transferu makromolekuł do krwi z zachowaniem ich aktywności biologicznej. Cechą charakterystyczną umożliwiającą rozpoznanie enterocytów płodowych jest obecność wakuol olbrzymich. Rozróżnia się dwa typy wakuol obecnych w enterocytach typu płodowego: wakuole olbrzymie typu transportowego i wakuole olbrzymie typu trawiennego. Wakuole transportowe są zdolne do przemieszczania się w świetle enterocyty i pojawiają się tuż po pierwszym karmieniu siałą. Wakuole tworzące się w części nadjądrowej enterocyty gromadzą w swoim świetle substancje ze światła jelita pobrane w procesie endocytozy, następnie przemieszczają się do części podstawnej komórki, gdzie uwalniają swoją zawartość na drodze egzocytozy do przestrzeni międzykomórkowej, skąd trafia ona do naczyń limfatycznych i krwionośnych. Jest to niezwykle istotny sposób transferu makromolekuł siały, określany mianem otwartej bariery jelitowej, a obserwowany w pierwszych 2 dniach życia postnatalnego u prosiąt. W przeciwieństwie do wakuol transportowych, wakuole trawienne nie są zdolne do przemieszczania się. U prosiąt ssących leżą one są nadjądrowo i zajmują nierzadko 2/3 objętości enterocyty. W ich świetle gromadzone są pobrane składniki pokarmowe siały i mleka, a przyłączające się do wakuol pęcherzyki lizosomów uwalniają enzymy prowadząc do ich rozkładu. Końcowe produkty trawienia, m. in. aminokwasy i cukry proste trafiają do krwi. Główne gruczoły trawienne przewodu pokarmowego noworodków – ślinianki, żołądek i trzustka - charakteryzują się niską pojemnością sekrecyjną enzymów. Podobnie niska aktywność proteolityczna i lipolityczna cechuje enzymy rąbka szczoteczki enterocytów. Ze względu na niedojrzałość systemu trawiennego zadaniem tych wakuol jest czynny udział w trawieniu składników pokarmowych.

Obecność enterocytów typu płodowego oraz związane z nimi zjawisko otwarcia bariery jelitowej jest bardzo istotne ze względu na nieselektywny transport pożądaných substancji. W procesie nieselektywnej endocytozy u prosiąt ze światła jelita wchłaniane są peptydy regulacyjne, czynniki wzrostowe, hormony oraz markery egzogenne i immunoglobuliny siały. Z drugiej strony anomalie w wymianie enterocytów grożą dysfunkcją bariery jelitowej wiąże się z zaburzeniami jej funkcji i podatnością na infekcje patogenami jelitowymi rozwijającymi się w choroby takie jak: jelit martwicze zapalenie jelit (NEC), otyłość, celiakia oraz alergie pokarmowe.

Literatura:

- Amdi, C., Krogh, U., Flummer, C., Oksbjerg, N., Hansen, C. F., Theil, P. 2013. Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. *Journal of Animal Science* 91, s. 5605–5613, <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6824>.
- Mickiewicz, M., Zabielski, R., Grenier, B. i wsp. 2012. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63, s. 225–239.

5. 2. Najistotniejsze osiągnięcia opisane w cyklu prac.

Najistotniejsze osiągnięcia opisane w cyklu prac:

- opracowanie metody preparacji tkanek przewodu pokarmowego do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym;

- szczegółowy opis rozwoju układu pokarmowego prosiąt we wczesnym okresie postnatalnym, udokumentowany licznymi mikrofotografiami ze skaningowego mikroskopu elektronowego;
- propozycja metody szacowania powierzchni chłonnej jelita cienkiego w oparciu o gęstość kosmków na jednostkę powierzchni z wykorzystaniem parametrów morfometrycznych: długości i szerokości kosmków jelitowych;
- wykazanie różnic w morfologii enterocytów prosiąt z syndromem wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu i enterocytów prosiąt urodzonych z normalną masą urodzeniową;
- zaproponowanie hipotezy wyjaśniającej szybkie zwiększenia powierzchni chłonnej jelita cienkiego we wczesnym okresie postnatalnym;
- opis udziału enterocytów typu płodowego w procesie dojrzewania błony śluzowej jelita w oparciu o badania własne i dostępną literaturę.

5. 3. Zastosowania naukowe i aplikacyjne przedstawionych prac.

Aspekty poznawcze i praktyczne przedstawionych prac:

Poznawczy:

– badania podstawowe umożliwiają prześledzenie/poznanie kolejnych etapów rozwoju układu pokarmowego,

Praktyczny:

– układ pokarmowy świń jest coraz częściej stosowany, jako model do badań biomedycznych, a uzyskane wyniki są reprezentatywne dla człowieka,

– uzyskana wiedza pozwala na optymalizowanie strategii żywieniowych stosowanych w okresie przedodsadzeniowym jak i poodsadzeniowym prosiąt, przyczyniając się do poprawy dobrostanu zwierząt hodowlanych.

6. Pozostałe zainteresowania naukowo badawcze.

Pozostałe zainteresowania naukowo - badawcze dotyczą następujących zagadnień:

1. Badania nad taksonomią, biologią i ekologią nicieni entomopatogenicznych oraz ich symbiontów bakteryjnych. Ich efektem było scharakteryzowanie polskich izolatów *Steinernema silvaticum*, porównanie różnych metod oceny infekcyjności i patogeniczności larw inwazyjnych nicieni entomopatogenicznych oraz opis symbiontów bakteryjnych *Steinernema poinari*.

Lis, M., Sajnaga, E., Kreft, A., Skrzypek, T., Kazimierczak, W. 2018. Characterization of Polish *Steinernema silvaticum* isolates (Nematoda: *Steinernematidae*) using morphological and molecular data. *Journal of Helminthology* 1-11, doi: 10.1017/S0022149X18000366.

Kazimierczak, W., Lis, M., Skrzypek, T., Kreft, A. 2018. Comparison of the methods for the pathogenicity assessment of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 63 (2), s. 289-298, doi: 10.1007/s10526-017-9856-2.

Sajnaga, E., Kazimierczak, W., Skowronek, M., Lis, M., Skrzypek, T., Waśko, A. 2018. *Steinernema poinari* (Nematoda: *Steinernematidae*): a new symbiotic host of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii*. *Archives of Microbiology*. doi: 10.1007/s00203-018-1544-9.

2. Badania z zakresu opisu i klasyfikacji taksonomicznej pasożytów układu pokarmowego zwierząt towarzyszących, wolno-żyjących oraz egzotycznych. Badania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej dotyczą identyfikacji pasożytów w oparciu o ich cechy morfologiczne, a także możliwości wykrywania form rozwojowych i dyspersyjnych w materiale biologicznym.

Szczepaniak, K., Listos, P., Łopuszyński, W., Skrzypek, T., Kazimierczak, W. 2012. Granulomatous peritonitis in a European brown bear caused by *Baylisascaris transfuga*. *Journal of Wildlife Diseases* 48 (2), s. 517-519, doi: 10.7589/0090-3558-48.2.517

Tomczuk, K., Szczepaniak K., Skrzypek, T. 2014. Tasiemczyca-narastający problem w hodowli koni w Polsce. *Życie weterynaryjne* 89 (11).

Szczepaniak, K., Łojczyk-Szczepaniak, A., Tomczuk, K., Skrzypek, T., Lisiak, B., Abd-Al-Hammza, Z. 2016. Canine *Trichomonas tenax* mandibular gland infestation. *Acta Veterinaria Scandinavica* 58, s. 15-15, doi: 10.1186/s13028-016-0197-4.

Tomczuk, K., Szczepaniak, K., Łojczyk-Szczepaniak, A., Skrzypek, T., Junkuszew, A., Dudko, P., Bojar, W. 2017. Występowanie form dyspersyjnych pasożytów wewnętrznych w kale głuszców z hodowli na terenie Polski. *Medycyna Weterynaryjna* 73(11), s. 702-707.

3. Badania nad zastosowaniem transmisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej w analizie i obrazowaniu powierzchniowych białek obecnych w warstwie S bakterii *Lactobacillus sp.* Bakterie z rodzaju *Lactobacillus sp.* występujące na powierzchni błon śluzowych jelit u ludzi traktowane są jako bakterie probiotyczne. Na powierzchni tych Gram dodatnich bakterii występuje charakterystyczna warstwa powierzchniowa S, zbudowana z białek o niskiej masie cząsteczkowej. Białka powierzchniowe tej warstwy charakteryzują się szeregiem ciekawych właściwości, m. in. umożliwiają bakteriom przeżycie i namnażanie się na powierzchni błony śluzowej jelita, wykazują zdolność adhezji do komórek nabłonkowych jelita, zdolność wiązania jonów metali ciężkich oraz hamują namnażanie się bakterii z rodzajów *Shigella*, *Salmonella* i *Escherichia*. Techniki mikroskopii elektronowej umożliwiły po wcześniejszej preparatyce wykazanie różnic występujących w powierzchniowej warstwie S pomiędzy różnymi szczepami bakterii.

Waśko, A., Polak-Berecka, M., Kuzdraliński, A., Skrzypek, T. 2014. Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strain. *Anaerobe* 25, s. 53-60.

Polak-Berecka, M., Waśko, A., Paduch, R., Skrzypek, T., Sroka-Bartnicka, A. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. 2014. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106(4), s. 751-62.

Polak-Berecka, M., Boguta, P., Cieśla, J., Bieganski, A., Skrzypek, T., Czernecki, T., Waśko, A. 2017. Studies on the removal of Cd ions by gastrointestinal lactobacilli.

Applied Microbiology and Biotechnology 101(8), s. 3415-3425, doi:10.1007/s00253-016-8048-9.

4. Badania zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego u ludzi obejmujące zarówno degenerującą się i zanikającą tkankę chrzęstną jak i zmieniającą się i przyrastającą warstwę podchrzęstną. Rozpoczęte badania mają na celu zobrazowanie zmian powstałych na skutek zmian patologicznych w obrębie stawu kolanowego człowieka. Analiza powierzchni chrząstki stawowej oraz warstwy podchrzęstnej, a także ich przekrojów poprzecznych przy zastosowaniu technik skaningowych umożliwi dokładniejszą ocenę ich struktury oraz pozwala zobrazować większą powierzchnię w porównaniu do klasycznej techniki histologicznej opartej na skrawkach parafinowych. Dodatkowo analiza w mikroskopie skaningowym pozwala, uzyskać obrazy o znacznie lepszej jakości i rozdzielczości niż popularnie stosowana artroskopia, która z grubsza umożliwia ocenę powierzchni stawowej ale całkowicie jest nie przydatna w ocenie warstwy podchrzęstnej stawu. SEM umożliwia ocenę poszczególnych włókien kolagenowych i wzajemnego przestrzennego ich rozmieszczenia oraz porównania zmian pomiędzy układem włókien, jakie zachodzą wraz z postępem choroby zwyrodnieniowej stawu. Dodatkowo SEM umożliwia ocenę stanu warstwy podchrzęstnej gdzie dochodzi do zagęszczenia i zwiększonego upakowania beleczek kostnych i zaburzenia architektury warstwy podchrzęstnej wraz z postępem zmian zwyrodnieniowych.

5. Badania nad zmianami w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego myszy, wywołanych kacheksją nowotworową. Projekt ma na celu odpowiedź na pytanie: czy skrajne wyniszczenie organizmu zwierzęcia ma wpływ na układ pokarmowy i strukturę błony śluzowej, kiedy zwierzę, pomimo wyniszczenia i znacznej utraty masy ciała, aktywnie pobiera pokarm.

6. Opracowanie procedury analizy wielkości kryształków wody w medium, w którym utrzymywane są plemniki przeznaczone do inseminacji z zastosowaniem systemu cryo-transferu. Badania miały na celu opracowanie procedury, która umożliwiłaby ocenę stanu nasienia, pobieranego od zwierząt i przechowywanego przez dłuższy czas w celu późniejszego wykorzystania.

Murawski, M., Schwarz, T., Grygier, J., Patkowski, K., Oszczeda, Z., Jelkin, I., Kosiek, A., Gruszecki, T. M., Szymanowska, A., Skrzypek, T., Zieba, D. A., Bartlewski, P. M. 2015. The utility of nanowater for ram semen cryopreservation. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 240(5), s. 611-7, doi:10.1177/15353702145572.

7. Analiza powierzchni owoców i warzyw pokrytych powłokami biopolimerowymi o właściwościach protekcyjnych. W celu dłuższego przechowywania warzyw i owoców opracowuje się kompozycje roztworów powłokotwórczych, które umożliwiają zachowanie świeżości warzyw i owoców, a także zapobiegają ich psuciu w trakcie składowania i magazynowania. W tym celu monitorowane są zmiany sensoryczne, fizyko-chemiczne, biochemiczne i mikrobiologiczne zachodzące w powlekanym żywności. Ważnym aspektem wytwarzania warstw wierzchnich stanowi ich ocena jakościowa. W oparciu o techniki mikroskopowe opracowywane są metody, które umożliwią ocenę grubości oraz topografii formowanych powłok. Badania przyczyniają się do powstania bazy wiedzy przydatnej w projektowaniu aktywnych materiałów opakowaniowych. Efektem końcowym są receptury innowacyjnych materiałów powłokowych ograniczających straty wartości odżywczej, prozdrowotnej i handlowej środków spożywczych podczas ich długotrwałego przechowywania.

Kowalczyk, D., Zięba, E., Skrzypek, T., Baraniak, B. 2017. Effect of carboxymethyl cellulose/candelilla wax coating containing ascorbic acid on quality of walnut (*Juglans regia* L.) kernels. *International Journal of Food Science and Technology*, Article ID: IJFS13420, doi: 10.1111/ijfs.13420.

Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Złotek, W., Skrzypek, T. 2017. Antifungal resistance and physicochemical attributes of apricots coated with potassium sorbate-added carboxymethyl cellulose-based emulsion. *International Journal of Food Science and Technology*, Article ID: 13997313, doi:10.1111/ijfs.13648.

7. Perspektywy badawcze.

Dalsze badania będą koncentrowały się na analizie zmian rozwojowych w układzie pokarmowym prosiąt urodzonych z syndromem IUGR. Prześledzenia wymaga rozwój błony śluzowej prosiąt w okresie wczesno urodzeniowym i poodsadzeniowym w celu zrozumienia początkowego zahamowania wzrostu, a następnie jego akceleracji (catch-up grow), który pojawia się u noworodków urodzonych z syndromem IUGR. Ten intensywny wzrost prowadzi do szybkiego zwiększenia wagi, co dzieje się jednak kosztem odkładania dużej ilości tłuszczu w organizmie.

Ponadto planowane jest przystosowanie metody kriotransferu dla skaningowej mikroskopii elektronowej do badań *interstitium* przewodu pokarmowego ssaków. Badania własne, w których tkanki układu pokarmowego poddaje się procesowi utrwalenia wskazują, że taka procedura zawsze prowadzi do zmian w strukturze większości tkanek. Należy wyraźnie podkreślić, że tkanki procesowane są zmienione i odbiegają strukturą od żywych. W świetle ostatnich badań opublikowanych w 2018 w *Scientific Reports* w artykule: “Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues” (Benias i wsp., 2018) istotne wydaje się zrozumienie funkcjonowania *interstitium* w tkankach przewodu pokarmowego. *Interstitium* jest traktowane jak rozbudowany narząd w ciele zwierzęcia – stanowi zespół połączonych ze sobą przestrzeni wypełnionych cieczą. Taka organizacja największego narządu w ciele człowieka, który zawiera do 20% płynów ustrojowych czyni go trudnym do zbadania. Większość technik związanych z przygotowaniem tkanek do obserwacji silnie ingeruje w ich strukturę np. poprzez proces odwadniania, uniemożliwiając obserwacje tak delikatnej struktury jaką jest *interstitium*. Metoda kriotransferu jest przydatna w tego typu badaniach. Tkanki nie są wcześniej procesowane, lecz zamrażane w ciekłym azocie i umieszczane w komorze mikroskopu, gdzie po powierzchniowej sublimacji poddawane są obserwacji. Dzięki zastosowaniu kriotransferu możliwe jest uniknięcie powstawania artefaktów spowodowanych preparatyką.

8. Podsumowanie dorobku i dane bibliometryczne.

8.1. Publikacje

Publikacje	artykuły naukowe		monografie
	lista A MNiSW	lista B MNiSW	
przed uzyskaniem stopnia doktora	5	5	2
po uzyskaniu stopnia doktora z cyklem publikacji	19	5	1
cykl publikacji	5	0	1
SUMA	24	10	3

8.2. Punkty uzyskane za publikacje z listy A

Punkty uzyskane za publikacje z listy A	IF z roku wydania	IF aktualny 5-letni	liczba punktów MNiSW z roku wydania	aktualna liczba punktów MNiSW
przed uzyskaniem stopnia doktora	9,5	9,723	108	135
po uzyskaniu stopnia doktora bez uwzględnienia cyklu publikacji	17,154	27,031	367	360
cykl publikacji	4,244	8,939	125	125
SUMA	30,898	45,693	600	620

8.3. Punkty uzyskane za publikacje z listy B i monografie

Punkty uzyskane za publikacje z listy B i monografie.	aktualna liczba punktów MNiSW
przed uzyskaniem stopnia doktora	57
po uzyskaniu stopnia doktora bez uwzględnienia cyklu publikacji	18
cykl publikacji	30
SUMA	105

8.4. Cytowania i indeks Hirscha (na dzień 18.09.2018)

Cytowania i indeks Hirscha	Web of Science	Scopus	Google Scholar	Research Gate
Ilość cytowań	85 (81)	168	256	180
Indeks Hirscha	5	6	8	7(6)

Jeśli, 17.10.2018

Skrypek Tomasz