



Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

AUTOREFERAT

dr Monika Słupecka-Ziemilska

Jabłonna 2019

1. Imię i nazwisko:

Monika Słupecka-Ziemilska (z domu Słupecka)

2. Dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu pracy doktorskiej:

- **doktor nauk biologicznych w zakresie biologii** (2009), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Tytuł pracy doktorskiej: *Rola egzogennej leptyny i greliny w procesie przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt* (promotor pracy: prof. dr. hab. Stefan Grzegorz Pierzynowski);
- **studia podyplomowe „Prowadzenie i monitorowania badań klinicznych”** (2008), Akademia Leona Koźmińskiego w Warszawie;
- **magister biologii w zakresie biologicznych podstaw produkcji zwierzęcej** (2005), Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Temat pracy magisterskiej: *Wpływ egzogennej leptyny na apoptozę w komórkach błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt* (promotor pracy: prof. dr. hab. Romuald Zabielski) (dyplom obroniony z wyróżnieniem);
- **Kurs „Biotechnologia Zwierząt”** (luty-czerwiec 2005) na Royal Veterinary and Agricultural University (obecnie Uniwersytet Kopenhaski) w ramach programu Erasmus Socrates.

3. Informacje o poprzednim zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- **kwiecień 2010 – obecnie ***, adiunkt w Instytucie Fizjologii i Żywienie Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie.
- **listopad 2005 - marzec 2010**, asystent w Instytucie Fizjologii i Żywienie Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie.
- **sierpień 2005 - listopad 2005**, specjalista w Instytucie Fizjologii i Żywienie Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie.

* marzec 2015- marzec 2016; październik 2018 - październik 2019 urlopy macierzyńskie i rodzicielskie z tytułu urodzenia dwójki dzieci.

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wpływ obestatyny zawartej w mleku matki na rozwój struktury i funkcji jelita cienkiego potomstwa we wczesnym okresie postnatalnym”

b) Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania, punktacja MNiSW według komunikatu obowiązującego w roku wydania pracy i wskaźnik Impact Factor zgodnie z rokiem wydania)

1. **Słupecka M**, Pierzynowski SG, Kuwahara A, Kato I, Woliński J. 2014. Age-dependent effect of obestatin on intestinal contractility in Wistar rats. *General and Comparative Endocrinology*, 208:109- 15.
IF=2,47; punkty MNiSW=25 **

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, współudziale w wykonaniu doświadczeń polegających na analizie aktywności skurczowej wycinków jelita cienkiego in vitro, opracowaniu i interpretacji wyników badań, napisaniu wstępnej oraz finalnej wersji manuskryptu. Mój udział szacuję na 80%.

2. **Słupecka M**, Romanowicz K, Woliński J. 2016. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation influences obestatin and ghrelin concentrations in milk and plasma of Wistar rat dams and their offspring. *International Journal of Endocrinology*, 2016: 5739763.
IF=2,51; punkty MNiSW=20 *

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, przygotowaniu materiału do oznaczeń poziomu badanych peptydów, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu wstępnej oraz finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Słupecka M**, Grzesiak P, Kwiatkowski J, Gajewska M, Kuwahara A, Kato I, Woliński J. 2017. The influence of enteral obestatin administration to suckling rats on intestinal contractility. *General and Comparative Endocrinology*, 248: 69-78.
IF=2,564; punkty MNiSW=25 *

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, wykonaniu pomiarów aktywności skurczowej jelita cienkiego, analiz immunohistochemicznych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu wstępnej oraz finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

4. **Słupecka-Ziemilska M**, Woliński J, Herman A.P, Romanowicz K, Dziegielewska Z, Borszewska-Kornacka M.K. 2017. Influence of preterm delivery on ghrelin and obestatin concentrations in maternal plasma, milk and their expression in mammary epithelial cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(5): 693-698.
IF=2,478; punkty MNiSW=25 *

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, pobraniu materiału biologicznego od pacjentek, przygotowaniu materiału biologicznego do oznaczeń stężenia peptydów, opracowaniu metody izolacji komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego (MEC), izolacja MEC, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu wstępnej oraz finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.

5. **Słupecka-Ziemilska M**, Grzesiak P, Jank M, Majewska A, Rak A, Kowalczyk P, Kato I, Kuwahara A, Woliński J. 2018. Small intestinal development in suckling rats after enteral obestatin administration. *PLoS One*. Oct 19;13(10):e0205994.
IF=2,766; punkty MNiSW=40 *

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, wykonaniu analiz: morfometrycznych, histometrycznych, immunohistochemicznych, aktywności enzymów jelitowych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, napisaniu wstępnej oraz finalnej wersji manuskryptu. Mój udział

procentowy szacuję na 65 %.

* badania finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki (Konkurs Sonata) nr 2011/03/D/NZ9/03697 pt. „Wpływ obestatyiny zawartej w mleku matki na rozwój struktury i funkcji jelita cienkiego potomstwa we wczesnym okresie postnatalnym”.

** badania finansowane ze środków dotacji na utrzymanie potencjału badawczego Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie; temat badań statutowych III.3.2.1: Wpływ substancji biologicznie czynnych (hormonów) na rozwój struktury i funkcji układu pokarmowego u nowo narodzonych i rosnących zwierząt - na modelu świni i szczura.

Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:

- wg listy czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Punkty MNiSW) - **135 pkt.**

- łączny współczynnik wpływu (IF) - **12,788**

c) Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe w Załączniku V.

d) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Schorzenia przewodu pokarmowego są częstym zjawiskiem obserwowanym we wczesnym okresie postnatalnym. Szczególnie narażone są na nie wcześniaki oraz noworodki o niskiej masie urodzeniowej. Główną przyczyną schorzeń jelita we wczesnym okresie postnatalnym jest nie w pełni dojrzały przewód pokarmowy. Funkcjonalne dysfunkcje przewodu pokarmowego, w tym jelita cienkiego to głównie zaburzona aktywność motoryczna oraz związane z nią upośledzone wchłanianie związków pokarmowych ze światła jelita. Konsekwencją tych zaburzeń są biegunki, ulewania, kolki jelitowe czy w skrajnych przypadkach nawet martwicze zapalenie jelit (ang. *necrotizing enterocolitis*, NEC).

Rozwój przewodu pokarmowego u ssaków rozpoczyna się w życiu płodowym i trwa aż do momentu odsadzenia od matki. Warto zaznaczyć, że proces rozwoju to skojarzenie wzrostu i dojrzewania tkanek przewodu pokarmowego. Rozwój we wczesnym okresie postnatalnym jest procesem niezwykle dynamicznym, kontrolowanym przez szereg czynników, zarówno o charakterze endogennym (program genetyczny), jak i środowiskowym. Do czynników o charakterze środowiskowym odpowiedzialnych za rozwój przewodu pokarmowego należy przede wszystkim dieta potomstwa, którą we wczesnym okresie stanowi mleko matki. Mleko nie tylko dostarcza niezbędnych do wzrostu składników odżywczych, jest także źródłem biologicznie aktywnych substancji, które w istotny sposób wpływają na dojrzewanie komórek i tkanek.

Badania wskazują również na udział biologicznie aktywnych składników mleka matczynego w procesie programowania żywieniowego. Programowanie żywieniowe jest elementem konceptu zwanego programowaniem rozwojowym, który zakłada, że warunki oddziałujące na płód oraz we wczesnym okresie postnatalnym mają istotny wpływ na rozwój i funkcjonowanie tkanek i narządów. Mogą również programować metabolizm organizmu (Langley-Evens 2006). Wykazano, że potomstwo karmione mlekiem matki cechuje lepszy rozwój funkcji poznawczych oraz mniejsze ryzyko wystąpienia chorób autoimmunologicznych (m.in. cukrzyca typu pierwszego, nieswoiste zapalenia jelit) i metabolicznych (m.in. otyłość, nadciśnienie tętnicze) w dzieciństwie oraz dorosłym życiu (Golding i wsp. 1997). Choć do tej pory nie sformułowano listy biologicznie aktywnych składników mających efekt programujący, to przypuszcza się, że obecne w mleku peptydy zaangażowane w metabolizm glukozy oraz tłuszczy (np. leptyna, grelina) mogą mieć istotny udział w tym procesie.

Badania z zakresu programowania rozwojowego z uwagi na konieczność pełnej kontroli warunków, na które wystawiony jest płód, jego matka oraz potomstwo prowadzone są na modelach zwierzęcych. Ze względu na krótki czas ciąży oraz życia osobniczego większość badań przeprowadza się na gryzoniach. Dodatkowo w badaniach dotyczących dojrzewania jelita cienkiego ssące szczury wydają się być dobrym modelem dla wcześniaków ludzkich ponieważ przewód pokarmowy gryzoni w momencie urodzenia jest dużo mniej dojrzały niż przewód pokarmowy donoszonych noworodków. Dodatkowo, dojrzewanie przewodu pokarmowego gryzoni przebiega bardzo szybko, do momentu odsadzenia czyli w ciągu pierwszych 21 dni życia.

Obestatyna została odkryta w 2005 roku przez Zhang'a i wsp. (2005). Peptyd ten powstaje podczas posttranslacyjnej obróbki polipeptydowej cząsteczki preprogreliny

(prekursora greliny). Podobnie, jak w przypadku greliny, żołądek jest głównym miejscem syntezy obestatyny. Pierwsze wyniki badań nad fizjologiczną funkcją obestatyny wskazywały na jej rolę w zmniejszaniu łaknienia oraz obniżaniu przyrostów masy ciała, co mogło świadczyć o tym, że peptyd ten jest endogennym antagonistą greliny. Pierwsze badania nad obestatyną wskazywały również na jej hamujący wpływ na opróżnianie żołądka oraz aktywność spontaniczną izolowanych fragmentów jelita czczego (Zhang i wsp 2005). Kolejne grupy badawcze publikowały dane, w których zarówno potwierdzano jak i zaprzeczano wcześniej uzyskanym wynikom (Ataka i wsp. 2008; De Smet i wsp. 2007), Z kolei badania zespołów Gourcerol i wsp. (2006), jak również Bassil i wsp. (2007) wskazywały na brak efektu obestatyny na aktywność motoryczną przewodu pokarmowego zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Należy zaznaczyć, iż wszystkie wspomniane badania zostały przeprowadzone na dorosłych gryzoniach - szczurach bądź myszach. Brak było natomiast badań na zwierzętach nowo narodzonych i rosnących. Jednocześnie badania Zhao i wsp. (2008) pokazały obecność komórek immunoreaktywnych w kierunku obestatyny w żołądku szczura już od pierwszego dnia życia, natomiast Aydin i wsp. (2008) wykazali obecność obestatyny w sianie i mleku ludzkim, co sugerowało udział tego peptydu w procesie rozwoju we wczesnym okresie postnatalnym.

Celem badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było określenie wpływu obestatyny zawartej w mleku matki na rozwój struktury i funkcji jelita cienkiego potomstwa we wczesnym okresie postnatalnym.

Celem badań zaprezentowanych w publikacji 1 było :

- ***określenie wpływu egzogennej obestatyny na aktywność skurczową jelita cienkiego in vitro w zależności od wieku zwierząt.***

Badania *in vitro* przeprowadzono na izolowanych fragmentach dwunastnicy oraz jelita czczego (środkowy odcinek) pobranych od szczurów (stado Wistar) w różnym wieku: zwierząt ssących matkę (7, 14, 21 dzień życia); zwierząt odsadzonych (28 dzień życia) oraz sobników dorosłych (setny dzień życia). Fragmenty jelita z całym przekrojem ściany umieszczono w łaźni organowej i traktowano obestatyną w dawce 1 μ mol/L. Analizowano zarówno spontaniczną aktywność skurczową jelita traktowanego obestatyną, jak również aktywność indukowaną rosnącymi, kumulującymi dawkami acetylocholin (ACh). Badano również odpowiedź jelita na stymulację impulsami elektrycznymi o rosnącej częstotliwości. Doświadczenia te wykazały, że wpływ obestatyny na aktywność skurczową jelita jest zależny zarówno od wieku zwierząt, jak i badanego odcinka jelita. Analiza spontanicznej aktywności skurczowej jelita cienkiego wykazała istotny wzrost amplitudy i częstotliwości skurczów

środkowego odcinka jelita czczego u zwierząt od 7 do 28 dnia życia. Natomiast u zwierząt dorosłych zaobserwowano efekt odwrotny potwierdzając wcześniejsze prace (Zhang i wsp. 2005). Dla odmiany analiza aktywności skurczowej jelita indukowanego rosnącymi dawkami ACh wykazała istotny wzrost pobudliwości segmentów pochodzących ze środkowego odcinka jelita czczego zwierząt ssących (7-21 dniowych) traktowanych obestatiną, w porównaniu do segmentów kontrolnych (traktowanych NaCl). Co ciekawe, w dwunastnicy traktowanie obestatiną powodowało istotny spadek pobudliwości jelita u zwierząt 14 i 21 dniowych.

Dodatkowo wykazano, że poza segmentami jelita pobranymi od zwierząt 7 dniowych segmenty jelita traktowane obestatiną wykazują istotnie większą wrażliwość na atropinę oraz tetradotoksynę (TTX), co sugeruje wpływ obestatyny na neurony cholinergiczne. Uzyskane wyniki wskazują również na rozwojowe zmiany w pobudliwości jelita wynikające najprawdopodobniej z różnic w zawartości i/lub wrażliwości receptorów oraz/lub wydzielaniu neurotransmiterów.

Zaobserwowano zwiększoną pobudliwość jelita traktowanego obestatiną u zwierząt ssących, a w szczególności zwierząt między 14 a 21 dniem życia. Wyniki te wraz ze wspomnianymi wcześniej badaniami, dotyczącymi obecności komórek immunoreaktywnych w kierunku obestatyny w żołądku nowo narodzonych szczurów oraz obecnością peptydu w sianie i mleku sugerowały, iż egzogenna obestatina zawarta w mleku matki może mieć istotną rolę w procesie rozwoju jelita cienkiego u nowo narodzonych ssących szczurów i stanowiły przesłankę do zaplanowania doświadczeń mających na celu:

- *zbadanie stężenia obestatyny w mleku i osoczu samic szczura w czasie laktacji oraz sprawdzenie czy istnieje zależność między dietą matki w ciąży i laktacji, a stężeniem obestatyny i greliny w mleku i osoczu samic oraz osoczu potomstwa? (publikacja 2);*
- *zbadanie czy dożołądkowe podawanie obestatyny nowo narodzonym ssącym szczurom wpływa na rozwój jelita cienkiego? (publikacja 3 i 5).*

Stężenie obestatyny w osoczu i mleku szczurów oznaczono metodą radioimmunologiczną (RIA) (**publikacja 2**). Analizie poddano osocze krwi samic przed kojarzeniem, w trakcie ciąży (14 dzień) oraz w czasie laktacji (14 i 21 dzień). Dodatkowo, zbadano poziom obestatyny w osoczu krwi potomstwa w 14 i 21 dniu życia. W każdym ze wspomnianych punktów czasowych oznaczono również poziom greliny, z uwagi na szereg prac

wskazujących, że proporcja greliny do obestatyny może być istotnym wskaźnikiem homeostazy energetycznej organizmu oraz jego przystosowania się do zmian żywienia (Vicennati i wsp. 2007; Shen i wsp. 2013). Doświadczenie przeprowadzono na samicach karmionych w ciąży i laktacji dietą hodowlaną (5% tłuszczu, zwierzęta kontrolne) oraz ich potomstwie. Drugą grupę stanowiły samice karmione w ciąży i laktacji dietą wysokotłuszczową (30% tłuszczu) oraz ich potomstwo.

Stwierdzono, że u samic kontrolnych poziom obestatyny w osoczu krwi w ciąży i laktacji był stały. Nie wykazano również zmian w poziomie obestatyny w mleku w badanych punktach czasowych. Natomiast stężenie badanego peptydu u potomstwa obniżało się wraz z wiekiem. Stwierdzono również, iż stężenie obestatyny w mleku jest dwukrotnie wyższe niż w osoczu samic, co może sugerować, że obestatyne zawarta w mleku przynajmniej częściowo syntetyzowana jest w gruczole mlekowym. Przeprowadzone badania pokazały również, że dieta wysokotłuszczowa matki w ciąży i laktacji wpływa na stężenie obestatyny w osoczu w okresie laktacji, istotnie zwiększa też poziom peptydu w mleku. U potomstwa matek karmionych dietą wysokotłuszczową wykazano natomiast istotnie wyższy poziom obestatyny w 14 dniu życia.

W celu zbadania czy dożołądkowe podawanie obestatyny ssącym szczurom wpływa na rozwój jelita cienkiego przeprowadzono doświadczenie, w którym 14 dniowym szczurom podawano dwa razy dziennie przez okres 7 dni sondą do żołądka obestatyne w stężeniu 125 nmol/kg mc. lub 250 nmol/kg mc. oraz roztwór soli fizjologicznej (zwierzęta kontrolne).

Rozwojowe „okno czasowe” w którym zaplanowano podawanie obestatyny wynikało z obserwacji uzyskanych we wcześniej opisanych badaniach wskazujących na wrażliwość zwierząt 14-dniowych na zmiany w stężeniu obestatyny w mleku (**publikacja 2**) oraz pobudliwość ich jelita cienkiego na obestatyne w doświadczeniach *in vitro* (**publikacja 1**). Zaplanowano dożołądkowe podawanie peptydu, gdyż jest to droga jaką pokonuje obestatyne naturalnie występująca w mleku matki.

Wpływ podawania obestatyny na aktywność skurczową jelita cienkiego u ssących zwierząt badano przy użyciu łaźni organowej. Podobnie jak w doświadczeniu opisanym w publikacji 1 w badaniach użyto całych, tj. zawierających pełen przekrój ściany odcinków dwunastnicy oraz środkowego jelita czczego. Fragmenty jelita od zwierząt otrzymujących obestatyne w dwóch dawkach, a także zwierząt kontrolnych zostały poddane działaniu ACh, atropiny oraz TTX, a także impulsów elektrycznych o rosnącej częstotliwości (**publikacja 3**). Otrzymane wyniki wskazują, iż 7-dniowe dożołądkowe podawanie obestatyny ssącym szczurom zmniejsza amplitudę zarówno skurczów spontanicznych, jak i indukowanych ACh

w obydwu badanych odcinkach jelita. Ponieważ wyniki uzyskane w poprzednich doświadczeniach (publikacja 1) sugerowały oddziaływanie obestatyny na drodze cholinergiczej, w omawianej pracy zbadano również ekspresję receptorów muskarynowych (M2) oraz aktywność skurczową jelita badanych zwierząt w odpowiedzi na dokomorowe podanie atropiny oraz TTX. Zbadano również ilość oraz lokalizację śródmięszowych komórek Cajala (wyspecjalizowane komórki mięśniowe przewodu pokarmowego, pełniące funkcję rozrusznikową i odpowiedzialne za skoordynowany skurcz mięśniówki). Zgromadzone wyniki wykazały, że 7-dniowe podawanie ssącym szczurom obestatyny nie wpływa na liczbę komórek Cajala ani ekspresję receptorów muskarynowych (M2). Co więcej, dane uzyskane w dwunastnicy (wzrost częstotliwości skurczów po podaniu TTX) sugerują możliwość oddziaływania obestatyny poprzez zaangażowanie nerwów nieadrenergicznych i niecholinergiczych (NANC).

Uzyskanie wyników odmiennych w stosunku do tych otrzymanych w wyniku podawania obestatyny bezpośrednio do komory łąźni sugerowało, że podawanie obestatyny do żołądka – głównego miejsca syntezy obestatyny w organizmie może włączać inny mechanizm działania niż w przypadku, gdy peptyd ten jest podawany bezpośrednio do jelita. Hipotezę tę potwierdziły badania stężenia obestatyny w osoczu krwi oraz immunodetekcja peptydu w żołądku. Badania te zaprezentowano w **publikacji nr 5**.

Wykazano, że dożołądkowe podawanie wyższej dawki obestatyny (250 nmol/kg mc.) istotnie podnosi stężenie tego peptydu w osoczu krwi, w porównaniu do zwierząt kontrolnych otrzymujących roztwór soli fizjologicznej. Wyniki te wskazują, że peptyd podawany do żołądka przenika do krwiobiegu. Jednocześnie wykazano istotnie niższą ekspresję obestatyny w błonie śluzowej żołądka szczurów otrzymujących wysoką dawkę peptydu. Wyniki analizy immunohistochemicznej potwierdziła też immunodetekcja obestatyny w zeskrabinach błony śluzowej żołądka (wykonana metodą Western Blottingu). Wyniki te wskazują, że 7-dniowe podawanie obestatyny w dawce 250 nmol/kg mc. hamuje syntezę endogennej obestatyny w żołądku szczura. W celu zbadania wpływu dożołądkowego podawania obestatyny ssącym szczurom na dojrzewanie funkcjonalne jelita, wykonałam analizę aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego natomiast aby zbadać wpływ badanego peptydu na dojrzewanie struktury jelita wykonałam analizę histometryczną ściany jelita oraz pomiar intensywności procesów proliferacji i apoptozy w komórkach nabłonka błony śluzowej środkowego odcinka jelita czczego. Wykazałam istotnie niższe wartości badanych parametrów histometrycznych jelita (grubość błony śluzowej, długość kosmków jelitowych, głębokość krypt jelitowych) u zwierząt otrzymujących obie dawki obestatyny. U zwierząt otrzymujących niższą dawkę

peptydu zaobserwowane zmiany w histometrii jelita mogły być wynikiem wzrostu intensywności apoptozy komórkowej na szczycie kosmków, natomiast w grupie zwierząt otrzymujących obestatynę w dawce 250 nmol/ kg mc. nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności procesu apoptozy. Zaobserwowano natomiast istotny spadek aktywności mitotycznej komórek macierzystych krypt jelitowych. Dla odmiany analiza aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego u zwierząt otrzymujących niższą dawkę peptydu wykazała zmiany świadczące o opóźnionym dojrzewaniu jelita cienkiego, natomiast u zwierząt otrzymujących dawkę wysoką nie stwierdzono istotnych zmian, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki obu analiz wskazują na odmienny mechanizm działania obestatyny w jelicie cienkim, w zależności od dawki, a doprecyzowując, w zależności od tego czy suplementacja wpływa na endogenną ekspresję peptydu w żołądku.

Obserwacja, że podawanie obestatyny w dawce 250 nmoli/kg mc. wpływa hamująco na jej ekspresję w żołądku była dla mnie zaskoczeniem i stała się przyczynkiem do dalszych badań mających na celu określenie jak spadek ekspresji endogennej obestatyny wpływa na rozwój. Wykonane pomiary masy ciała, zawartości tłuszczu trzewnego, jak również dane morfometryczne jelita (masa, długość) nie wykazały istotnych różnic między badanymi grupami zwierząt. Zbadałam również czy zmiany w syntezie endogennego peptydu w żołądku wpływają na poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach błony śluzowej jelita cienkiego. Badanie to zostało przeprowadzone z wykorzystaniem testu (tzw. nicking assay) wskazującego na aktywność systemu naprawy DNA przez wycinanie zasad w szlaku błędnie sparowanych zasad tzw. BER (ang. Base Excision Repair). Aktywność enzymów naprawczych DNA (glikozylaz OGG1 oraz ANPG) została zbadana poprzez analizę poziomu wyciętych etenoadduktów DNA (1,N6-etenoadeniny dla ANPG i 8-oksoguaniny dla OGG1). Etenoaddukty DNA wykazują właściwości mutagenne i kancerogenne. Powstają zarówno w wyniku peroksydacji lipidów, jak i działania czynników zewnętrznych. Wykazano istotny wzrost poziomu obu typów adductów DNA w jelicie cienkim szczurów otrzymujących wyższą dawkę obestatyny. Dodatkowo, w homogenatach jelita cienkiego pobranych od tych zwierząt stwierdzono wzrost ekspresji genu *Cox-2* (cykloksygenaza-2). Wzrost ekspresji *Cox-2* w tkankach jest również uważany za marker stresu oksydacyjnego oraz uszkodzeń DNA komórki. Warto wspomnieć, że w warunkach fizjologicznych poziom ekspresji *Cox-2* w tkankach przewodu pokarmowego jest bardzo niski. Wzrost ekspresji *Cox-2* związany jest ze stanem zapalnym, gdyż enzym ten bierze udział w syntezie prostaglandyn. Prostaglandyny natomiast uczestniczą w wielu procesach biologicznych, regulują m.in. odpowiedź immunologiczną, ciśnienie krwi, zachowanie integralności przewodu pokarmowego, rozród.

Uważa się również, że Cox-2 jest czynnikiem prognostycznym nowotworu jelita grubego (Eberhart i wsp. 1994).

W celu poznania mechanizmu działania egzogennej obestatyny w przewodzie pokarmowym wykonane zostało badanie profilu ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy DNA (**publikacja 5**). Z uwagi na otrzymane wyniki wskazujące, że dożołądkowe podawanie obestatyny w dawce 250 nmol/kg mc. wykazuje większą aktywność biologiczną w jelicie analizie ekspresji genów poddane zostały wycinki żołądka i jelita cienkiego zwierząt otrzymujących wysoką dawkę obestatyny oraz od zwierząt kontrolnych. Badanie profilu ekspresji genów wykazało 131 genów wspólnych dla jelita i żołądka, których ekspresja uległa zmianie w wyniku dożołądkowego podawania obestatyny. Dalsza analiza bezpośredniej relacji między tymi genami wykazała kluczową rolę genów *MAP2K3* (mitogen-activated protein kinase 3) oraz *MAPK3* (mitogen-activated protein kinase-3). Geny te regulują odpowiedź komórki na sygnały zewnętrzne, w szczególności uczestniczą w szlakach biologicznych odpowiedzialnych za przeżycie komórki, proliferację, apoptozę, różnicowanie się komórek oraz biorą udział w procesie zapalnym. Warto również zaznaczyć, że kinazy te są również zaangażowane w proces aktywacji neutrofilów. Jest to istotna obserwacja, gdyż wspomniana synteza prostaglandyn w wyniku aktywacji Cox-2 ma miejsce w aktywowanych neutrofilach (He i wsp. 2001). Zgromadzone wyniki badań wskazują, że dożołądkowe podawanie ssącym szczurom obestatyny w dawce 250 nmol/kg mc. aktywuje szlaki sygnałowe związane z zapaleniem oraz procesami komórkowymi mogącymi mieć istotny wpływ na zachowania integralności komórek nabłonka jelita cienkiego. Co ciekawe szereg badań wskazuje na przeciwny do wykazanego przeze mnie efekt traktowania obestatyną tj. działanie przeciwzapalne, redukujące stres oksydacyjny oraz hamujące śmierć komórki na drodze apoptozy (Camiña i wsp 2007; Tang i wsp. 2014). Różnice między uzyskanymi wynikami własnymi, a pracami innych grup badawczych w moim przekonaniu wynikają z wykorzystania innych modeli badawczych (nowo narodzone zwierzęta vs. dorosłe osobniki oraz zdrowe zwierzęta vs. zwierzęta chore). Teorię tą potwierdzają wyniki doświadczeń Pomucku i wsp. (2013) wskazujące na przeciwzapalny wpływ obestatyny u szczurów cierpiących na zapalenie okrężnicy. Przy czym efekt obestatyny był zależny od tego czy zapalenie miało charakter ostry czy przewlekły. Wyniki te wskazują, że stan aktywności układu immunologicznego może determinować efekt obestatyny. Prezentowane przeze mnie badania dotyczą zwierząt młodych i zdrowych.

Fakt, że stężenia obestatyny w mleku jest istotnie wyższe niż poziom tego peptydu w osoczu krwi matek skłoniło mnie do postawienia hipotezy badawczej zakładającej, że peptyd

ten może być syntetyzowany bezpośrednio w gruczole mlekowym. zaplanowałam przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem prób osocza krwi oraz mleka pobranego od kobiet w pierwszym tygodniu laktacji. Celem doświadczenia było:

- *zbadanie poziomu obestatyny w mleku oraz osoczu krwi kobiet w pierwszym tygodniu laktacji oraz zbadanie biologicznego pochodzenia obestatyny zawartej w mleku (publikacja 4).*

Z uwagi na wcześniejsze prace wskazujące, że poziom biologicznie aktywnych peptydów w mleku może być zależny nie tylko od diety matki, ale również terminu porodu (Narang i wsp. 2006; Underwood 2013) doświadczenie przeprowadzono na materiale biologicznym zebranych od kobiet-/ pacjentek Szpitala Klinicznego WUM im. Księżnej Anny Mazowieckiej w Warszawie, które urodziły w terminie (po 36 tygodniu ciąży) oraz kobiet, które urodziły przedwcześnie (przed 36 tygodniem ciąży).

W celu zbadania biologicznego pochodzenia obestatyny zawartej w mleku opracowano metodę izolacji komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego (MEC) z mleka ludzkiego, a następnie zbadano w nich ekspresję wariantów splicingowych genu *GHRL* (kodującego preprogrelinę) odpowiadających za kodowanie greliny (ekson 1 i 2) oraz obestatyny (eksony 3 i 4), (Seim i wsp. 2016).

Radioimmunologiczna analiza stężenia obestatyny i greliny w osoczu i mleku oraz analiza ekspresji wariantów splicingowych dla genu *GHRL* wykazały że mimo, iż obestatyna i grelina są produktem tego samego genu ich ekspresja na poziomie genu oraz peptydu jest niezależna od siebie i kontrolowana przez różne mechanizmy. Pomimo, iż wykazano istotne różnice w ekspresji obu wariantów splicingowych w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego pomiędzy badanymi grupami, to na poziomie peptydu istotne zmiany zaobserwowano jedynie dla obestatyny. Jej stężenie było istotnie niższe w osoczu oraz mleku kobiet, które urodziły przed terminem. Warto zaznaczyć, że są to pierwsze badania wskazujące na syntezę greliny i obestatyny w gruczole mlekowym kobiet w trakcie laktacji. Jednocześnie, badania te potwierdzają, że wyizolowane z mleka MEC umożliwiają nieinwazyjne uzyskanie mRNA komórek gruczołu mlekowego o jakości umożliwiającej badania metodami biologii molekularnej.

Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały obecność obestatyny w mleku szczurzym oraz ludzkim. Uzyskane wyniki sugerują również, że część obestatyny zawartej w

mleku może być syntetyzowana *de novo* w gruczole mlekowym. Na poziom obestatyny w mleku wpływa dieta matki, jak również terminu porodu. Ponieważ skład mleka jest w pełni dopasowany do potrzeb noworodka, wykazane istotnie niższe stężenie obestatyny w mleku matek wcześniaków może mieć istotne znaczenie dla ich rozwoju. Należy zwrócić uwagę, że u dzieci urodzonych przedwcześnie bardzo często obserwuje się zaburzenia motoryki oraz wchłaniania, co jest skutkiem nie w pełni dojrzałego przewodu pokarmowego. Wyniki wskazujące na niższe stężenie obestatyny w mleku matek wcześniaków korespondują zatem z wynikami z doświadczeń *in vivo* na modelu szczurzym, wskazującymi na negatywny wpływ dożołądkowego podawania obestatyny ssącym szczurom na aktywność skurczową jelita cienkiego, jak również proces jego dojrzewania.

Zgromadzone wyniki poza aspektem poznawczym mogą być cenną wskazówką dla placówek banków mleka kobiecego w procesie rekrutacji dawczyń mleka. Pokazują bowiem, iż podwyższony poziom obestatyny w mleku kobiecym może mieć niekorzystny wpływ na rozwój jelita cienkiego. Dlatego też mleko z banku, które w polskich warunkach dedykowane jest w głównej mierze wcześniakom powinno pochodzić od dawczyń będących matkami wcześniaków, z uwzględnieniem diety matki w ciąży i laktacji.

LITERATURA

Ataka K, Inui A, Asakawa A, Kato I, Fujimiya M. Obestatin inhibits motor activity in the antrum and duodenum in the fed state of conscious rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008; 294: G1210-8.

Aydin S, Ozkan Y, Erman F, Gurates B, Kilic N, Colak R, et al. Presence of obestatin in breast milk: Relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women. *Nutrition*. 2008; 24: 689-693.

Bassil AK, Haglund Y, Brown J, Rudholm T, Hellstrom PM, Naslund E, Lee K, Sanger GJ. Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 150: 58-64.

Camiña JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez C, Casanueva FF. Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: Regulatory mechanisms. *Journal of Cell Physiology*. 2007; 211: 1-9.

De Smet B, Thijs T, Peeters TL, Depoortere I. Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterology and Motility*. 2007; 19: 211-7.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*.1994; 107(4): 1183-1188.

Golding J, Emmet PM, Rogers IS. Association between breast feeding, child development and behaviour. *Early Human Development*. 1997; 49: 175-184.

He LK, Liu LH, Hahn E, Gamelli RL. The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*. 2001; 22(1): 58-64.

Langley-Evens S.C. Developmental programming of health and disease. *Proceedings of Nutrition Society*. 2006; 65(1): 97-105.

Narang AP, Bains HS, Kansal S, Singh D. Serial composition of human milk in preterm and term mothers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2006; 21: 89-94.

Pamukcu O, Kumral ZNO, Ercan F, Yegen BC, Ertem D. Anti-inflammatory effect of obestatin and ghrelin in dextran sulfate sodium–induced colitis in rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2013; 57: 211-218.

Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivier J, St-Pierre DH, Tache Y. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides*. 2006; 27: 2811-9.

Seim I, Herington AC, Chopin LK. New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus. *Endocrine*. 2016; 52: 609-617.

Shen C, Yu T, Tang ZH, Wu KM. Changes in ghrelin and obestatin levels before and after a meal in children with simple obesity and anorexia. *Hormone Research in Paediatrics*. 2013;79(6): 341-6.

Tang S, Dong X, Zhang W. Obestatin changes proliferation, differentiation and apoptosis of porcine preadipocytes. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*. 2014; 75: 1-9.

Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatric Clinics of North America*. 2013; 60: 189-207.

Vicennati V, Genghini S, De Iasio R, Pasqui F, Pagotto U, Pasquali R. Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *European Journal of Endocrinology*. 2007; 157(3):295-301.

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, et al. Medicine: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science*. 2005; 310: 996-999.

Zhao CM, Furnes MW, Stenstrom B, Kulseng B, Chen D. Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell and Tissue Research*. 2008; 331:575-85.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Dorobek naukowy przed osiągnięciem stopnia doktora

Zagadnieniami związanymi z rozwojem przewodu pokarmowego nowo narodzonych ssaków oraz rolą biologicznie aktywnych peptydów siary i mleka matki w tym procesie zainteresowałam się już na studiach na kierunku Biologia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za sprawą prof. dr hab. Romualda Zabielskiego, który zaproponował mi udział w projekcie grantowym pt. „Rola egzogennej leptyny i greliny w procesie dojrzewania przewodu pokarmowego u nowo narodzonych prosiąt.” (Grant KBN nr PBZ-KBN-093/P06/2003). Projekt ten realizowany był we współpracy z Instytutem Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie. W ramach w/w projektu badałam wpływ dożołądkowego podawania leptyny na proces apoptozy w komórkach nabłonka jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt. Wykazałam, że suplementacja preparatu mlekozastępczego dla prosiąt egzogenna leptyna powoduje nasilenie aktywności proliferacyjnej oraz spadek apoptozy w komórkach nabłonka jelita cienkiego. Uzyskałam też interesujące wyniki wskazujące na zaangażowanie czynników para- i autokrynych „włączających” apoptozę w komórkach nabłonka kosmków jelitowych. Praca wykonana pod kierunkiem profesora Zabielskiego została wyróżniona i otrzymała nagrodę Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (praca magisterska o najwyższych walorach naukowych w roku akademickim 2005). Otrzymane wyniki zostały opublikowane w pracy, której jestem współautorem (Godlewski i wsp. 2005).

Zaraz po ukończeniu studiów otrzymałam propozycję kontynuowania prac nad rolą biologicznie aktywnych peptydów siary i mleka w rozwoju jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt. Rozpoczęłam prace w IFiZZ PAN w Jabłonie i zaangażowałam się w tematykę badawczą prowadzoną w Zakładzie Fizjologii Przewodu Pokarmowego. W w/w projekcie badawczym zajęłam się zagadnieniem roli egzogennej leptyny i greliny w procesie przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt. Był to temat mojej rozprawy doktorskiej. Pierwsze, częściowe wyniki prowadzonych przeze mnie doświadczeń zostały opublikowane w *Journal of Animal and Feed Science* (Słupecka i Woliński 2007). Założenia swojej rozprawy doktorskiej oraz warsztat metodyczny opisałam w artykule popularnonaukowym opublikowanym na łamach *Forum Akademickiego*. Za

Artykuł ten otrzymałam III nagrodę w konkursie popularyzatorskim czasopisma pt. „Skomplikowane i proste - młodzi naukowcy o swoich badaniach”. W okresie prowadzenia prac nad rozprawą doktorską pogłębiałam też swoją wiedzę w zakresie centralnych mechanizmów kontroli łąknienia u nowo narodzonych prosiąt, czego efektem była praca przeglądowa (Rogozińska i wsp. 2009). Odbyłam też pierwsze krótkookresowe staże naukowe na Uniwersytecie w Lund. W zespole prof. dr. hab. Stefana Grzegorza Pierzynowskiego brałam udział w badaniach nad rolą immunoglobulin siary w procesie zamykania bariery jelitowej u nowo narodzonych prosiąt. Pierwszym etapem tych badań było opracowanie modelu doświadczalnego. Specyficzna budowa łożyska świni (tzw. łożysko rzekome) uniemożliwia transport immunoglobulin w okresie płodowym. Nowo narodzone prosię rodzi się pozbawione ochrony immunologicznej, nabiera jej wraz z pobraniem siary. Udało nam się utrzymać w warunkach laboratoryjnych noworodków prosiąt odseparowanych od matek zaraz po porodzie- niessących siary. Opracowaliśmy sposób podawania immunoglobulin z wykorzystaniem preparatów stosowanych do leczenia żywieniowego drogą dojelitową. W omawianym okresie czasu wynikiem tych prac było doniesienie konferencyjne (Załącznik III, poz.III.B.20).

Rozprawę doktorską obroniłam 17 czerwca 2009 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem prof. dr. hab. Stefana Grzegorza Pierzynowskiego. W rozprawie doktorskiej pt. „Rola egzogennej leptyny i greliny w procesie przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt” wykazałam, że karmienie prosiąt preparatem mlekozastępczym skutkuje spowolnieniem procesu przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego w porównaniu do karmienia siarą i mlekiem matki. Uzupelnienie karmienia preparatem mlekozastępczym o egzogenne peptydy (leptyna lub grelina) prowadzi do zmiany dynamiki procesu przebudowy nabłonka jelitowego. Wykazałam również, że sposób podania badanych peptydów (do żołądka vs. do dwunastnicy) istotnie jakościowo zmienia charakterystykę procesu przebudowy nabłonka. Podawanie leptyny (dożołądkowo) oraz greliny (do dwunastnicy) stymuluje rozwój jelita cienkiego oraz ma efekt troficzny. Wykazałam również obecność surwiwiny w błonie śluzowej jelita cienkiego prosiąt. Surwiwina jest białkiem należącym do inhibitorów apoptozy. Jej obecność wykazano wcześniej w narządach płodowych natomiast w zróżnicowanych, dorosłych tkankach nie stwierdza się jej ekspresji. Wykazałam wysoki poziom ekspresji surwiwiny u prosiąt karmionych preparatem mlekozastępczym co może być wynikiem wolniejszej wymiany enterocytów płodowych na

dorośle, i świadczy o spowolnionym procesie przebudowy nabłonka jelitowego u tych zwierząt.

Godlewski MM, **Słupecka M**, Woliński J, Skrzypek T, Skrzypek H, Motyl T, Zabielski R. Into the unknown- the death pathways in the neonatal gut epithelium. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56 Suppl 3:7-24.
IF= 2,212

Słupecka M, Woliński J. Preliminary results on exogenous ghrelin administration via stomach tube influence on the crypt cell proliferation in the small intestine mucosa of neonatal piglets. *Journal of Animal and Feed. Science* 2007; 16(3): 445-451.
IF= 0,305

Rogozińska K, Woliński J, **Słupecka M**, Pierzynowski SG. Neonatal development and central appetite regulation. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2009; 3: 084-090.

Słupecka M. Życiodajny pokarm. *Forum Akademickie* 4/2008.

Słupecka M, Woliński J, Pierzynowski. Wyssane z mlekiem matki. *ACADEMIA* nr 3(15)/2008.

Doniesienia konferencyjne opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

Załącznik III, poz.III.B.1-21.

5.2. Dorobek naukowy po osiągnięciu stopnia doktora

Po osiągnięciu stopnia doktora kontynuowałam **badania nad rolą leptyny oraz greliny w procesie przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt** uzupełniając zgromadzone wyniki o ekspresję genu kodującego grelinę w błonie śluzowej jelita cienkiego ssących prosiąt (hybrydyzacja *in situ*) oraz stężenie badanych peptydów w mleku loch oraz osoczu potomstwa.

Słupecka M, Woliński J, Pierzynowski SG. The effects of enteral ghrelin administration on the remodeling of the small intestinal mucosa in neonatal piglets. *Regulatory Peptides* 2012; 10(174): 38-45.
IF=2,056

Woliński J, **Słupecka M**, Romanowicz K. Leptin and ghrelin levels in colostrum, milk and blood plasma of sows and pig neonates during the first week of lactation. *Animal Science Journal* 2014; 85(2): 143-149.
IF=0,96

Kontynuowałam zapoczątkowane **badania nad rolą autofagii w procesie przebudowy nabłonka jelitowego oraz wpływem egzogennej leptyny i greliny na intensywność tego procesu**. Osiągnęłam wyniki wskazujące, iż autofagia (proces polegający na kontrolowanym rozkładzie całych komórek lub ich organelli) jest zaangażowana w proces przebudowy nabłonka jelita cienkiego u ssących prosiąt. Dożołądkowe podawanie leptyny prosiętom karmionym preparatem mlekozastępczym istotnie zmniejszyło intensywność tego procesu w nabłonku jelitowym. Wykazałam również, że w odróżnieniu do prosiąt ssących lochę oraz tych karmionych samym preparatem mlekozastępczym, u zwierząt otrzymujących leptynę tylko ok 50% komórek z ekspresją białka markerowego dla autofagii (MAP1LC3) ma morfologię komórek apoptotycznych (skondensowana chromatyna, pyknotyczne jądra). Wskazuje to, iż wykazany przeze mnie wcześniej antyapoptotyczny efekt leptyny może być wynikiem procesu autofagii pełniącej funkcję „obronną” przed wejściem komórki na „ścieżkę” apoptozy. Badania te wykonałam we współpracy z dr hab. Małgorzatą Gajewską z Katedry Nauk Fizjologicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

Słupecka M, Woliński J, Gajewska M, Pierzynowski SG. Enteral leptin administration affects intestinal autophagy in suckling piglets. *Domestic Animal Endocrinology* 2014; 46:12-9.
IF=2,171

Kontynuując prace nad procesem przebudowy błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych ssaków zwróciłam uwagę na **proces podziału krypt jelitowych (tzw. *crypt fission*) i jego przebieg**. Wykazałam, iż zjawisko to jest istotne w procesie wzrostu jelita cienkiego, a jego natężenie może być markerem rozwoju, gdyż jest ono endogennie zaprogramowane w czasie. Obserwacje te opublikowałam na łamach czasopisma *Livestock Science*.

Słupecka M, Woliński J, Pierzynowski SG. Crypt fission contributes to postnatal epithelial growth of the small intestine in pigs. *Livestock Science*. 2010; 133(1): 34-37.
IF= 1,295

Kontynuowałam również współpracę z zespołem profesora Stefana Pierzynowskiego i **badania nad rolą immunoglobulin siary w rozwoju przewodu pokarmowego oraz ośrodkowego układu nerwowego u nowo narodzonych prosiąt z wykorzystaniem**

opracowanego modelu doświadczalnego. Stwierdziliśmy, że zastąpienie siary preparatem stosowanym do leczenia żywieniowego drogą dojelitową istotnie wpływa, zarówno na rozwój jelita, jak i mózgu. U zwierząt tych zaobserwowaliśmy istotny spadek masy ciała oraz wartości parametrów histomerycznych ściany jelita cienkiego. Wykazaliśmy również obniżenie poziomu specyficznego białka astrocytów GFAP (z ang. *Glial fibrillary acidic protein*) oraz proliferacji komórek mikrogleju w porównaniu do prosiąt ssących siarę. Dla odmiany suplementacja preparatu dojelitowego immunoglobuliną typu G (IgG) normalizowała parametry rozwoju jelita oraz mózgu do wartości obserwowanych u prosiąt ssących siarę. Dodatkowo, u prosiąt pozbawionych immunoglobulin w pierwszych dobach życia wykazano spadek ekspresji syntazy tlenku azotu w błonie mięśniowej jelita cienkiego, co może oznaczać zmiany w neuroprzeżywalności w neuronach enterycznego układu nerwowego.

Pierzynowski S, Ushakova G, Kovalenko T, Osadchenko I, Goncharova K, Gustavsson P, Prykhodko O, Woliński J, **Słupecka M**, Ochniewicz P, Weström B, Skibo G. Impact of colostrum and plasma immunoglobulin intake on hippocampus structure during early postnatal development in pigs. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2014; 35:64-71.
IF=2,58

Woliński J, **Słupecka M**, Weström B, Prykhodko O, Ochniewicz P, Arciszewski M, Ekblad E, Szwiec K, Ushakova, Skibo G, Kovalenko T, Osadchenko I, Goncharova K, Botermans J, Pierzynowski S. Effect of feeding colostrum versus exogenous immunoglobulin G on gastrointestinal structure and enteric nervous system in newborn pigs. *Journal of Animal Sciences* 2012; 90 Suppl 4:327-330.
IF=2,093

W trakcie pobytów na Uniwersytecie w Lund (Szwecja) byłam również zaangażowana w badania przedkliniczne dla przemysłu (firma Alnara, USA). Badania te prowadzone były na rosnących prosiętach i dotyczyły **poszukiwania skutecznej terapii enzymatycznej w leczeniu niedoczynności zewnątrz wydzielniczej trzustki**. Dodatkowo, w badaniach tych pełniłam funkcję koordynatora grupy badawczej odpowiedzialnego za prowadzenie badań zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną (GLP, ang. Good Laboratory Practice).

Słupecka M, Woliński J, Prykhodko O, Ochniewicz P, Gruijc D, Fedkiv O, Weström BR, Pierzynowski SG. Stimulating effect of pancreatic-like enzymes on the development of the gastrointestinal tract in piglets. *Journal of Animal Science* 2012; 90 Suppl 4: 311-314.
IF=2,093

oraz doniesienie konferencyjne: Załącznik III, poz.III.B.38.

Włączyłam się również w **projekt badawczy „Stan funkcjonalny i stabilność ekosystemu przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów żywionych paszami modyfikowanymi genetycznie”** (Projekt KBN nr N N311 517540, kierownik dr Jan Czerwiński). W projekcie tym byłam odpowiedzialna za badanie wpływu pasz GMO na proces przebudowy nabłonka błony śluzowej jelita cienkiego u kurcząt. Badania wykazały, że żywienie kurcząt paszami GMO nie wpływa na morfometrię jelita oraz przebudowę nabłonka jelitowego. Wykazano również mniejsze pobudzenie układu immunologicznego u kurcząt żywionych paszami GMO, w porównaniu do kurcząt żywionych paszami niemodyfikowanymi.

Czerwiński J, **Słupecka-Ziemilska M**, Woliński J, Barszcz M, Konieczka P, Smulikowska S.. The use of genetically modified Roundup Ready soybean meal and genetically modified MON 810 maize in broiler chicken diets. Part 2. Functional status of the small intestine. *Journal of Animal and Feed Science* 2015; 24(2): 144-152.
IF=0,511

oraz doniesienie konferencyjne: Załącznik III, poz.III.B.24.

Uczestniczyłam również w projektach badawczych prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Przewodu Pokarmowego **„Rozwój aktywności motorycznej przewodu pokarmowego u nowo narodzonych prosiąt - rola greliny i obestatyny”** (NCN nr 2012/05/B/NZ9/00901) oraz **„Wpływ wybranych czynników wzrostu na rozwój żuchwy u pacjentów z anodoncją” – model świni** (NCN nr. 2015/17/B/NZ9/01447) (kierownik dr hab. Jarosław Woliński). Wyniki uzyskane w tych projektach zostały zaprezentowane w monografii, której jestem współautorem.

Woliński J, Goncharova K, Wychowański P, **Słupecka-Ziemilska M**. 2016. Oddziaływanie na rozwój przewodu pokarmowego młodych ssaków. Wybrane aspekty. Wydawca: Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna. ISBN 978-83-945468-6-1).

oraz doniesienia konferencyjne:
Załącznik III, poz.III.B.25; poz.III.B.26; poz.III.B.32; poz.III.B.34; poz.III.B.35.

W roku 2012 rozpoczęłam pracę badawczą nad własnym projektem finansowanym przez NCN „**Wpływ obestatyiny zawartej w mleku matki na rozwój struktury i funkcji jelita cienkiego potomstwa we wczesnym okresie postnatalnym**” (2011/03/D/NZ9/03697, konkurs Sonata). Wyniki dotyczące roli obestatyiny stanowią podstawę osiągnięcia naukowego i zostały omówione powyżej (punkt 4b, publikacje 1-4 oraz doniesienia konferencyjne: Załącznik III, poz.III.B.27, poz.III.B.28 poz.III.B.30, poz.III.B.33, poz.III.B.37). Projekt realizowałam we współpracy z Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (zespół dr hab. Michała Janka) oraz Warszawskim Uniwersytetem Medycznym (zespół prof. dr hab. Marii Katarzyny Borszewskiej-Kornackiej). Dodatkowo, materiał biologiczny pobrany w ramach doświadczeń nad wpływem diety wysokotłuszczowej samicy (tzw. diety zachodniej) w ciąży i laktacji na poziom obestatyiny i greliny w mleku oraz osoczu krwi samic i potomstwa został wykorzystany do **badania nad rolą diety matki w programowaniu rozwoju układu rozrodczego potomstwa**. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z zespołem prof. dr hab. Ewy Gregoraszczuk oraz prof. dr hab. Barbary Bilińskiej (Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie). Zbadano wpływ diety wysokotłuszczowej na ekspresję adipokin (leptyny oraz adiponektyny) oraz hormonów steroidowych (testosteron, estradiol) w narządach układu rozrodczego (leptyna, adiponektyna), tkance tłuszczowej (leptyna) oraz osoczu krwi samic i potomstwa (adiponektyna). Badania te wykazały, że dieta wysokotłuszczowa matki w ciąży i laktacji zaburza syntezę badanych hormonów u potomstwa i może mieć niekorzystny programujący wpływ na ich rozród.

Rak A, Hejmej A, **Słupecka-Ziemilska M**, Woliński J, Fiedor E, Bilińska B, Gregoraszczuk EŁ. Maternal High-Fat Diet During Pregnancy and Lactation has Opposite Effects on Gonadal Expression of Leptin and Leptin Receptor in Rat Dams and Their Offspring. *Hormone and Metabolic Research* 2017; 49(9): 707-715.
IF=2,56.

Gregoraszczuk E, **Słupecka M**, Wolinski J, Hejmej A, Bilinska B, Fiedor E, Piwnicka N, Rak A. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation had gender difference effect on adiponectin in rat offspring. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2016; 67(4): 543-553.
IF=2,478.

oraz doniesienie konferencyjne: Załącznik III, poz.III.B.36.

Z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym współpracuje od kilku lat. **Współpraca dotyczy roli biologicznie aktywnych peptydów mleka w rozwoju fizjologicznym noworodków ludzkich.** Wynikiem współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Borszewską-Kornacką (Szpital Kliniczny im księżnej Anny Mazowieckiej) oraz dr Aleksandrą Wesołowską (Klinika Neonatologii) są dwie prace przeglądowe.

Wesołowska A, **Słupecka-Ziemilska**, Borszewska-Kornacka MK. Wybrane hormony mleka kobiecego i ich wpływ na regulacje metabolizmu noworodka. *Klinika Pediatryczna* 2018; 26(3): 348-52.

Słupecka M, Woliński J, Herman AP, Ochniewicz P, Kornacka MK. Biological role of obestatin in physiology and pathophysiology. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 2012; 16(1): 47-52.

Warto zaznaczyć, że razem z prof. dr hab. Katarzyną Borszewską-Kornacką oraz dr Aleksandrą Wesołowską współpracujemy również w Fundacji Bank Mleka Kobiecego. Fundacja upowszechnia wiedzę na temat wartości pokarmu kobiecego, stosowania terapii żywieniowej mlekiem matki oraz wspierania powoływania placówek banków mleka w Polsce. Swoją wiedzę w zakresie roli biologicznie aktywnych peptydów mleka w rozwoju nowo narodzonych ssaków wielokrotnie dzieliłam się w ramach organizowanych przez Fundację wykładów dla personelu medycznego (Warsztaty Wiedzy o Laktacji) czy też spotkań dla rodziców (Akademia Mama Pyta).

W ostatnich latach poszukując nowych biologicznie aktywnych substancji mogących wpływać na rozwój przewodu pokarmowego u nowo narodzonych ssaków wraz z kolegami z Zakładu Fizjologii Zwierząt zainteresowaliśmy się kwasem alfa keto-glutarowym. Zebrana do badań literatura została opublikowana w formie artykułów przeglądowych. Aktualnie ubiegam się o środki na finansowanie badań: „**Wpływ dożołądkowego podawania AKG na proces dojrzewania jelita cienkiego oraz wybranych funkcji ośrodkowego układu nerwowego u nowo narodzonych szczurów**”.

Grzesiak P, **Słupecka-Ziemilska M**, Woliński J. The biological role of α -ketoglutaric acid in physiological processes and its therapeutic potential. *Developmental Period Medicine* 2016; 20(1): 61-7.

Woliński J, **Słupecka-Ziemilska** M, Boryczka M, Grzesiak P, Kwiatkowski J, Kotarba G. Small intestine motility development in newborn mammals. *Developmental Period Medicine* 2016; 20(1): 53-60.

Niedawno rozpoczęłam współpracę z dr Edytą Molik z Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Złożony został projekt, w którym mam pełnić rolę wykonawcy. Celem projektu jest zbadanie wartości odżywczej siary i mleka owczego oraz parametry rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i układu pokarmowego jagniąt w zależności od terminu wykotu oraz **określenie przydatności siary i mleka owczego, jako żywności o specjalnym przeznaczeniu – badania *in silico***. Wstępne, wykonane przez nas badania poziomu prolaktyny oraz leptyny w mleku owczym sugerują, że długość dnia może mieć istotne znaczenie w kształtowaniu składu chemicznego mleka (doniesienie konferencyjne: poz.III.B.40).

Zainicjowałam i od roku 2012 (cyklicznie co 2 lata) organizuję Warsztaty Naukowe w Jabłonie. Celem tego wydarzenia jest umożliwienie młodym naukowcom (studentom, doktorantom) poszerzanie wiedzy w zakresie fizjologii jak również prezentowanie swoich badań, dyskusji wyników oraz zdobywanie doświadczenia w prowadzeniu sesji naukowych. Warsztaty obejmują wykłady zaproszonych gości- doświadczonych, uznanych pracowników polskich i zagranicznych jednostek naukowych oraz krótkie doniesienia ustne zgłaszane przez studentów. Dzięki pozyskiwanym dotacjom udział młodych naukowców aktywnie uczestniczących w Warsztatach jest bezpłatny.

Podsumowując, mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 67 prac naukowych, na które składa się: 26 oryginalnych prac twórczych, z których 18 opublikowano w czasopismach ujętych w bazie Journal Citation Reports (JCR) i 8 prac w czasopismach nieujętych w bazie JCR, ponadto 1 monografia, oraz 40 komunikatów prezentowanych na konferencjach (w tym 35 na konferencjach o zasięgu międzynarodowym).

Przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowałam 5 prac oryginalnych (w tym 2 ujęte w bazie JCR) oraz 21 doniesień konferencyjnych, a po obronie doktoratu opublikowałam 21 prac oryginalnych (w tym 16 ujętych w bazie JCR oraz 5 prac w czasopismach nieujętych w bazie JCR), 1 monografię oraz 19 doniesień konferencyjnych.

Łączna liczba punktów MNiSW dla całości dorobku naukowego wynosi: 554 pkt.

Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: 37,017.

Liczba cytowań publikacji (z wyłączeniem autocytowań) według bazy Web of Science (WoS) wynosi: 70; według bazy Scopus 121 (na dzień 14.03.2019).

Indeks Hirscha według bazy WoS oraz Scopus wynosi: 6 (na dzień 14.03.2019).

Prowadziłam badania w ramach 7 projektów badawczych (w tym 1 własny). Jestem promotorem 2 prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym w 1 otwartym przewodzie doktorskim.

Wykonałam 14 recenzji manuskryptów prac do czasopism z listy JCR.

Wykaz wszystkich moich publikacji oraz działań składających się na moją aktywność naukową, w tym informacje o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzacji nauki przedstawiłam w załączniku III.

Monika
Słupecka-Ziemilska