

II SYMPOZJUM KNOW:

**„ZDROWE ZWIERZĘ
– BEZPIECZNA ŻYWNOŚĆ”**

oraz

XII SYMPOZJUM:

**„GENETYCZNE, FIZJOLOGICZNE
I ŚRODOWISKOWE UWARUNKOWANIA
ROZRODU I ZDROWIA ZWIERZĄT ORAZ
BEZPIECZEŃSTWA I JAKOŚCI ŻYWNOŚCI
POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO”**

Wierzba, 18-20 czerwca 2018 r.

Organizatorzy:

**Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW)
Konsorcjum Naukowe „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”
(nr decyzji 05-1/KNOW2/2015)**

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie
(główny organizator)

Wydział Medycyny Weterynaryjnej UW-M w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Państwowy Instytut Weterynarii

– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

oraz

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
PAN w Jabłonie

Program

18 czerwca 2018 r. (poniedziałek)

15:00-17:30 – Rada Programowa KNOW

Przyjazd pozostałych uczestników do Domu Pracy Twórczej PAN w Wierzbie

19:00 – spotkanie towarzyskie i rozmowy kulturalowe – kolacja w formie grilla

19 czerwca 2018 r. (wtorek)

8³⁰-8⁴⁵ Otwarcie Sympozjum:

dziekani Wydziałów i dyrektorzy Instytutów

Wystąpienia gości honorowych

8⁴⁵-13⁰⁰ SESJA I (CZĘŚĆ I):

**GENETYCZNE, EPIGENETYCZNE I FIZJOLOGICZNE
PODSTAWY DOSKONALENIA CECH PRODUKCYJNYCH
I FUNKCJONALNYCH ORAZ ZDROWIA ZWIERZĄT**

*(Prowadzący: prof. Tomasz Motyl, prof. Dariusz J. Skarżyński,
dr hab. Grzegorz Skiba, prof. Lech Zwierzchowski)*

8⁴⁵-9³⁰ Wykład I:

Prof. Monika Kaczmarek (*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
PAN*): **Programowanie płodności na przestrzeni pokoleń.**

– Dyskusja

9³⁰-10¹⁵ Wykład II:

Prof. Monika Bugno-Poniewierska (*Instytut Nauk Weterynaryjnych,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*): **Diagnostyka mutacji
chromosomowych koni – od barwień prążkowych do mikromacierzy.**

– Dyskusja

10¹⁵-11¹⁵ Sesja doniesień I (każde 10 minut):

1. **Mgr Roberta Arena** (*IGiHZ PAN*): The role of cytoplasmic lipids in the development of mammalian embryos.
2. **Dr Piotr Kaczyński** (*IRZiBŻ PAN*): Rola sygnału zarodkowego świnii w regulacji ekspresji enzymów zaangażowanych w procesy metylacji DNA.
3. **Mgr Maria Guzewska** (*IRZiBŻ PAN*): Lokalizacja elementów szlaku biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w błonie śluzowej macicy i trofoblastach.
4. **Dr n. wet. Piotr Socha** (*WMW UW-M*): Praktyczne zastosowanie ultrasonografii w ocenie rozwoju ciąży i wyznaczaniu terminu porodu u zwierząt towarzyszących.

11¹⁵-11³⁰ Przerwa kawowa

11³⁰-13⁰⁰ Sesja doniesień II (każde 10 minut):

1. **Mgr Grzegorz Grodkowski** (*IGiHZ PAN*): Zmiany w behawiorze krów jako wskaźnik ich zdrowotności.
2. **Dr inż. Monika Sobol** (*IFiZZ PAN*): Wpływ inuliny na rozwój kości.
3. **Mgr Mateusz Szudzik** (*IGiHZ PAN*): Wykorzystanie innowacyjnej suplementacji prosiąt żelazem w zapobieganiu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza oraz jej wpływ na rozwój osobniczy i jakość tuszy świń.
4. **Mgr Bartosz Przybył** (*IFiZZ PAN*): Rola neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*BDNF*) w modulacji podwzgórzowej neurohormonalnej sieci regulującej apetyt.
5. **Dr Bartosz Fotschki** (*IRZiBŻ PAN*): Wpływ preparatu wytłokowego z malin na syntezę oraz profil kwasów żółciowych w treści jelita ślepego szczurów Wistar.
6. **Dr inż. Paweł Konieczka** (*IFiZZ PAN*): Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do wizualizacji biofilmu w przewodzie pokarmowym kurcząt żywionych dietami z dodatkiem probiotyku.
– Dyskusja

13⁰⁰-14⁰⁰ Obiad

14⁰⁰-17³⁰ SESJA II:

BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE ZWIERZĄT GOSPODARSKICH, WOLNO ŻYJĄCYCH ORAZ ŚRODOWISKA

(Prowadzący: *prof. Marcin Bańbura, prof. Andrzej Koncicki, prof. Jacek Kuźmak*)

14⁰⁰-14⁴⁵ Wykład III:

Dr hab. Krzysztof Śmietanka, prof. nadzw. (*Państwowy Instytut Weterynaryjny PIB*): **Zmienność wirusa grypy ptaków i jej wpływ na przebieg zakażeń i epidemiologię grypy u drobiu i ptaków dzikich.**

– Dyskusja

14⁴⁵-15³⁰ Wykład IV:

Dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM (*Wydział Medycyny Weterynaryjnej UW-M*): **Zastosowanie rekombinowanego białka kapsydu cirkowirusa gołębiego do oceny seroprewalencji PiCV u gołębi reprodukcyjnych oraz pobudzania swoistej odporności przeciwko temu wirusowi.**

– Dyskusja

15³⁰-16⁰⁰ Przerwa kawowa

16⁰⁰-17¹⁵ Sesja doniesień I (każde 10 minut):

1. **Mgr Justyna Miłek** (*PIW-PIB*): Ocena występowania i charakterystyka molekularna koronawirusów w populacji dzikich ptaków w Polsce.
2. **Dr hab. Agata Banczerz-Kisiel, prof. UWM** (*WMW UW-M*): Zastosowanie HRMA do oceny korelacji między polimorfizmem genu *ail* a biotypem szczepów *Yersinia enterocolitica*.
3. **Dr Ewelina Patyra** (*PIW-PIB*): Wieloskładnikowa metoda wykrywania i oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w paszach techniką LC-MS/MS.
4. **Lek wet. Łukasz Panasiuk** (*PIW-PIB*): Mykotoksyny i ich metabolity w paszach dla zwierząt – nowe wyzwania w toksykologii weterynaryjnej i bezpieczeństwie żywności.
5. **Dr Kinga Urbaniak** (*PIW-PIB*): Indukcja pluripotencji makrofagów świń w kontekście uzyskania linii komórkowych do namnażania wirusa ASF.

– Dyskusja

20⁰⁰ Spotkanie towarzyskie i rozmowy kularowe

20 czerwca 2018 r. (środa)

8³⁰-10⁰⁰ SESJA III:

INNOWACYJNE METODY DIAGNOSTYKI, PROFILAKTYKI I TERAPII CHOROÓB ZWIERZĄT I LUDZI

(Prowadzący: prof. Bogdan Lewczuk, prof. Marek Łukaszewicz, prof. Mirosław Polak)

8³⁰-9¹⁵ Wykład V:

Dr Kinga Majchrzak (Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW):
Immunoterapia komórkowa w leczeniu nowotworów u psów.

– Dyskusja

9¹⁵-10⁴⁵ Sesja doniesień I (każde 10 minut):

1. **Dr n. wet. Michał Załęcki** (WMW UW-M): Przeciwwzapalna funkcja receptorów TRPA1 i TRPV1 w przebiegu eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka.
 1. **Dr Joanna Bukowska** (IRZiBŻ PAN): Wpływ TGFβ1, TGFβ3 oraz naskórkowych mediów pochodzących na cechy funkcjonalne fibroblastów skóry właściwej pochodzących od myszy Balb/c (Foxn1^{+/+}; model gojenia bliznowego) oraz myszy nude (Foxn1^{-/-}; model gojenia regeneracyjnego).
 2. **Dr n. med. Anna Szóstek-Mioduchowska** (IRZiBŻ PAN): Wpływ transformującego czynnika wzrostu- β na metaloproteinazy w procesie włóknienia macicy kłaczy.
 3. **Dr Kaja Urbańska** (WMW SGGW): The role of p38MAPK/MiTF axis in hematopoietic stem cells depletion in Fanconi anemia cells.
 4. **Mgr Łukasz Kiraga** (WMW SGGW): Komórkowe metody diagnozowania przerzutów nowotworowych w płucach myszy BALB/c metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).
 5. **Lek wet. Monika Tomczyk** (IFiZZ): Wpływ neostygminy na ekspresję interleukiny -1β i jej receptorów w wybranych strukturach mózgu owcy w czasie ogólnoustrojowego stanu zapalnego.
- Dyskusja

10⁴⁵-11¹⁵ Przerwa kawowa

11¹⁵-12⁴⁵ Sesja doniesień II (każde 10 minut):

1. **Dr hab. Marta Mendel** (WMW SGGW): Wpływ chlorofiliny na wchłanianie deoksyniwalenolu – badania *ex vivo*.
 2. **Lek. wet. Monika Zuśka-Prot** (WMW UW-M): Wpływ wziewnej i ogólnej glikokortykosteroidoterapii na liczebność limfocytów T CD4⁺ regulatorowych i efektorowych u myszy z modelem astmy alergicznej.
 3. **Dr Lidia Szulc-Dąbrowska** (WMW SGGW): Wpływ zakażenia wirusem ektromelii na poziom katepsyn i przetwarzanie antygeny w konwencjonalnych komórkach dendrytycznych.
 4. **Dr Piotr Bąska** (WMW SGGW): Ocena działania immunomodulacyjnego antygenów wydzielanych przez *Fasciola hepatica* (Fh-ES).
 5. **Dr Anna Gajda** (PIW-PIB): Alternatywne metody kontroli stosowania antybiotyków u zwierząt.
 6. **Mgr Magdalena Zalewska** (IGiHZ PAN): Odpowiedź immunologiczna gruczołu sutkowego bydła mlecznego na nawracające, chroniczne zapalenie spowodowane przez gronkowce koagulazo-dodatnie lub koagulazo-ujemne.
- Dyskusja

13⁰⁰ Zakończenie sympozjum i obiad

**SESJA
PLENARNA I**

Programowanie płodności na przestrzeni pokoleń*

M.M. Kaczmarek¹

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, Polska

Stan odżywienia oraz zdrowia dziecka w dużej mierze zależy od sposobu odżywiania matki zarówno przed, w czasie ciąży, ale również podczas karmienia piersią. Badania wykonane u ludzi i zwierząt wskazują na związek między sposobem żywienia na wczesnych etapach rozwoju a optymalizacją funkcji rozrodczych. I tak niedożywienie, spowodowane anoreksją lub ograniczonym spożyciem kalorii, opóźnia moment dojrzewania płciowego u ludzi, zakłóca cykl jajnikowy i opóźnia powrót prawidłowego cyklu po porodzie u zwierząt dojrzałych płciowo. Z drugiej strony osoby otyłe mają fenotyp podobny do tych spożywających ograniczoną liczbę kalorii. Obserwuje się u nich szereg zmian, w tym hormonach, prowadzących do obniżenia płodności. Aczkolwiek, otyłość w przeciwieństwie do niedożywienia, wywołuje przedwczesne dojrzewanie u dziewcząt.

Od czasu hipotezy „oszczędnego fenotypu” (ang. *thrifty phenotype*), zaproponowanej przez Halesa i Barkera w 1992 roku, liczne badania wykazały, że nieprawidłowości w odżywianiu zarówno przed, jak i po urodzeniu odpowiedzialne są za trwałe strukturalne oraz funkcjonalne zmiany w narządach i tkankach, nieprawidłowości w reakcji na bodźce endo- lub egzogenne oraz zmiany w epigenomie, które mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie. Należy podkreślić, że utrzymanie funkcji rozrodczych, a tym samym zachowanie gatunku, wymaga zarówno od samic jak i samców inwestycji

* Badania finansowano z: grantów Genomics Core Facility, PBRC, LSU, Baton Rouge, USA (COBRE – NIH 8 P20 GM103528-07, NORC – NIH 1P30-DK072476), dotacji statutowej IRZiBŻ PAN, Olsztyn oraz grantu KNOW2017/IRZiBŻ/GG/01/2 (Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”).

¹ e-mail: m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

w dużej mierze zależnej od dostępności substancji odżywczych. Jest to zjawisko bardzo złożone i dotychczas niepoznane zostały mechanizmy warunkujące sukces rozrodczy przy braku homeostazy, zwłaszcza w odniesieniu do programowania płodności na przestrzeni pokoleń.

Nasze badania skupiają się na wyjaśnieniu mechanizmów odpowiedzialnych za programowanie funkcji rozrodczych, ze szczególnym uwzględnieniem roli sposobu odżywiania matki w utrzymaniu płodności przyszłych pokoleń. Na modelu mysim wykazaliśmy, że poddanie matek (F0) restrykcyjnej diecie podczas laktacji prowadzi do nieprawidłowości w rozwoju funkcji rozrodczych potomstwa, pomimo wprowadzenia prawidłowej diety na późniejszych etapach życia. Zarówno samice, jak i samce (F1) później osiągały dojrzałość płciową i miały szereg innych zaburzeń wpływających na ich płodność, np. nieprawidłowości funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG). Interesujące, że efekty nieprawidłowej diety samic karmiących (F0) były zauważalne w kolejnych pokoleniach, u wnuków (F2; Kaczmarek *et al.* BMC Genomics). Nasze zainteresowania obejmują również określenie roli składników mleka w programowaniu płodności na przestrzeni pokoleń. Dostępność substancji odżywczych, białkowych, hormonów i czynników wzrostu przenoszonych przez mleko wydaje się być ściśle skorelowana z krótko- i długofalowymi efektami obserwowanymi na poziomie fenotypowym i molekularnym u potomstwa, które mogą utrzymywać się w kolejnych pokoleniach.

Tematyka naszych badań jest istotna ze względu na coraz częściej występujące zaburzenia szeroko pojętej płodności, a także wzrastającą liczbę nieprawidłowości żywieniowych u ludzi, których skutki mogą być obserwowane w kolejnych pokoleniach.

Diagnostyka mutacji chromosomowych koni – od barwień prążkowych do mikromacierzy*

M. Bugno-Poniewierska^{1,2}

¹ Instytut Nauk Weterynaryjnych, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Polska

Kluczową rolę w diagnostycznych badaniach cytogenetycznych odgrywa dobór technik badawczych oraz czytelność uzyskiwanych obrazów mikroskopowych. Pierwsze badania cytogenetyczne u koni zostały przeprowadzone na początku XX wieku, wykazując iż kariotyp konia składa się z 64 chromosomów z czego dwa to chromosomy płci w układzie XX u samic i XY u samców. W latach 70-tych XX wieku nastąpił rozwój technik barwienia różnicowego chromosomów (prążki G-, Q-, C-, R- oraz NOR), co umożliwiło pogłębioną analizę struktury chromosomów, ale również doprowadziło do potrzeby ujednoczenia opisu kariotypu. Obecnie obowiązujący wzorzec kariotypu konia został opracowany i opublikowany na III Międzynarodowej Konferencji Standaryzacji Kariotypu Konia w Davis w 1996 roku. Oparty jest on o barwienia chromosomów technikami GTG oraz RBA.

Przełomem w cytogenetycznej diagnostyce występowania aberracji chromosomów, umożliwiającej szybką i precyzyjną analizę płytek metafazowych było zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), która w przeciwieństwie do technik prążkowych pozwala na analizę większej ilości płytek metafazowych nawet o gorszej jakości i różnym stopniu spiralizacji chromosomów. Jest to szczególnie ważne w analizie prawidłowości kariotypu koni, u których większość nieprawidłowości występuje w formie mozaiki o niskim procentowym udziale metafaz z zaburzeniami w liczbie chromosomów.

* Badania finansowane z Grantu BIOSTRATEG nr BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

² e-mail: monika.bugno.poniewierska@gmail.com

Obecnie, dzięki rozwojowi molekularnych technik cytogenetycznych, do analizy kariotypu możliwe jest wykorzystanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH).

W odróżnieniu od techniki FISH, badanie metodą aCGH umożliwia identyfikację zmian w genomie bez uprzedniej wiedzy o ich istnieniu. Porównawcza hybrydyzacja genomowa na macierzach pozwala na ocenę wszystkich chromosomów w jednym badaniu. Jej ograniczeniem jest identyfikacja jedynie aberracji niezrównoważonych oraz brak na rynku komercyjnym macierzy CGH dedykowanych dla koni. Narzędziem do analizy aberracji strukturalnych genomu mogą być również mikromacierze SNP. Zaletą identyfikacji aberracji strukturalnych w oparciu o mikromacierze SNP jest wysoka precyzja, umożliwiając rozpoznanie aberrantnych regionów tak małych jak 150 tys. pz. Samo założenie konstrukcji mikromacierzy nie pozwala jednak na identyfikowanie translokacji, czy aberracji zrównoważonych w obrębie badanego regionu, tak jak w przypadku macierzy CGH.

Poprzez rozwój technik biologii molekularnej możliwa jest coraz precyzyjniejsza diagnoza aberracji chromosomowych oraz zmian kariotypu. W planowanych badaniach diagnostycznych należy jednak uwzględnić zarówno metody cytogenetyki klasycznej jak i molekularnej, biorąc pod uwagę koszty przeprowadzanych analiz i ich znaczenie dla hodowli koni.

SESJA I (Część I)

**Genetyczne, epigenetyczne i fizjologiczne
podstawy doskonalenia cech produkcyjnych
i funkcjonalnych oraz zdrowia zwierząt**

The role of cytoplasmic lipids in development of mammalian embryos*

Roberta Arena¹, Tomasz P. Wróbel², Paulina Koziol², Łukasz Gąsior³,
Joanna Rudnicka³, Grażyna E. Ptak^{3,4}

¹ *Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland*

² *Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland*

³ *Department of Developmental Biology, Małopolskie Centrum Biotechnologii UJ, Kraków, Poland*

Intracellular Lipid Droplets (ILDs) are cellular organelles rich of neutral lipid important for cell metabolism and energy homeostasis. In this work it has been hypothesized that ILDs could be an important source of energy for embryo during Embryonic Diapause (ED), a period of temporary suspension of embryo development at the blastocyst stage and characterized by delayed implantation. So the aim of this work is to evaluate the profile of ILDs during ED. To this aim ED has been induced in pregnant mouse females by ovariectomy on 2.5 day *post coitum* (dpc) and daily injection of progesterone. Blastocyst has been collected and fixed in 4% paraformaldehyde every 2 days, from 4.5 to 28.5 day *post coitum*. The profile of ILDs during ED was analysed by Coherent Anti-Stokes Raman scattering (CARS) and Fourier transform infrared (FT-IR) Imaging spectroscopy. Our preliminary results show that the numbers of ILDs and the total amount of lipids vary with time. However, a simple univariate approach to analysis does not bring a clear trend and application of more advanced multivariate methods is required.

* Research supported by KNOW – Leading National Research Centre – Scientific Consortium „Healthy Animal – Safe Food” (GA no. KNOW/IGHZ/RMK/PhD/2016/07 to GEP), by the National Science Centre of Poland (GA no. 2016/21/B/NZ3/03631 to GEP) and by European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Programme (GA no. 692185 to GEP).

⁴ e-mail: g.ptak@uj.edu.pl

Rola sygnału zarodkowego świni w regulacji ekspresji enzymów zaangażowanych w procesy metylacji DNA

Piotr Kaczyński

*Zakład Mechanizmów Działania Hormonów,
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Polska*

Ciało żółte (*łac. corpus luteum* – CL) jest przejściowym organem endokrynnym powstającym po owulacji z pękniętego pęcherzyka jajnikowego. Główną funkcją CL jest synteza i sekrecja progesteronu, który warunkuje implantację zarodka w błonie śluzowej macicy. Estradiol-17 β (E2) jest uważany za główny sygnał zarodkowy u świni, gdyż inicjuje on mechanizmy polegające na ochronie ciała żółtego przed luteolitycznym działaniem prostaglandyny F2 α W okresie tzw. matczynego rozpoznania ciąży między 11. a 12. dniem oraz w okresie implantacji między 15. a 25. dniem ciąży, zarodki świni wydzielają zwiększone ilości estrogenów, głównie estradiolu-17 β . Ostatnie badania wykazały, że estrogeny zaangażowane są także w proces metylacji DNA. Mając na uwadze zwiększoną syntezę i sekrecję estrogenów, w tym estradiolu-17 β , przez zarodki świni w okresie wczesnej ciąży, jak również udokumentowany wpływ E2 na ekspresję enzymów uczestniczących w procesach metylacji DNA, postanowiliśmy zbadać wpływ sygnału zarodkowego – E2 na ekspresję genów i białek enzymów regulujących procesy metylacji DNA w ciałku żółtym podczas wczesnej ciąży u świni, wykorzystując do tego model *in vivo*, w którym wydzielanie estradiolu-17 β przez zarodki naśladowano poprzez infuzje E2 bezpośrednio do światła macicy. Dodatkowo, jako grupę kontrolną wykorzystano ciała żółte pobrane poubojowo od loszek w 12. dniu cyklu rujowego bądź ciąży (n=7 dla każdej z grup). W homogenatach ciałek żółtych zbadano ekspresję genów oraz białek enzymów zaangażowanych w procesy metylacji DNA: DNMT1, DNMT3a oraz DNMT3b.

U zwierząt z modelu *in vivo*, ekspresja genu DNMT1 była istotnie wyższa w ciałkach żółtych pobranych od loszek otrzymujących infuzję E2 (833 ng / infuzję) w porównaniu do ekspresji w ciałkach żółtych loszek otrzymujących placebo ($p < 0.05$). Ekspresja genów DNMT3a oraz DNMT3b była istotnie niższa ($p < 0.01$; $p < 0.05$ odpowiednio) w ciałkach żółtych loszek otrzymujących infuzję E2 (33.3 μ g E2 / infuzję) niż w CLs u loszek otrzymujących infuzję placebo. W ciałkach żółtych pobranych od loszek w 12. dniu cyklu rujowego oraz 12. dniu ciąży nie zaobserwowano różnic w ekspresji genów DNMT1 i DNMT3a. Z kolei ekspresja genu DNMT3b była istotnie niższa ($p < 0.05$) w ciałkach żółtych pobranych od loszek w 12. dniu ciąży w porównaniu do ekspresji tych genów w CLs u loszek w 12. dniu cyklu rujowego. Ekspresja białka DNMT1 w ciałkach żółtych loszek otrzymujących infuzję E2 (33.3 μ g E2 / infuzję) była istotnie wyższa ($p < 0.05$) niż u loszek otrzymujących infuzję placebo. Ekspresja białek DNMT3a i DNMT3b była istotnie niższa ($p < 0.05$) w ciałkach żółtych loszek otrzymujących infuzję E3 (833 ng/infuzję) niż w CLs loszek, u których do obu rogów podawano placebo. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji białka DNMT1 w ciałkach żółtych loszek w 12. dniu cyklu rujowego i w 12. dniu ciąży. Z kolei ekspresja białek DNMT3a i DNMT3b w ciałkach żółtych loszek w 12. dniu ciąży była niższa ($p < 0.05$) w porównaniu do ekspresji tych białek w ciałkach żółtych loszek w 12. dniu cyklu rujowego.

Otrzymane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że estradiol-17 β reguluje ekspresję białek enzymów zaangażowanych w procesy metylacji DNA w ciałkach żółtych podczas wczesnej ciąży u świni. Stymulacja przez E2 ekspresji genu/białka DNMT1 w ciałkach żółtych u loszek w modelu *in vivo*, jak również brak różnic w ekspresji genu/białka DNMT1 w ciałkach żółtych u loszek w 12. dniu cyklu rujowego i ciąży może sugerować, że estradiol-17 β zaangażowany jest w podtrzymanie stałych wzorców metylacji DNA genów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania ciałek żółtych. Ponadto, obniżenie ekspresji genów/białek DNMT3a i DNMT3b w ciałkach żółtych loszek, którym podawano E2 do światła macicy, jak również obniżona ekspresja genów/białek DNMT3a i DNMT3b w ciałkach żółtych loszek w 12. dniu ciąży, może sugerować, że estradiol-17 β może chronić ciałka żółte przed metylacją DNA *de novo*, co mogłoby zaburzać prawidłowe funkcjonowanie ciałek żółtych podczas wczesnej ciąży u świni.

Lokalizacja elementów szlaku biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w błonie śluzowej macicy i trofoblastach*

M.M. Guzewska¹, Y. Heifetz², M.M. Kaczmarek^{1,3}

¹ *Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland*

² *The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel*

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. *extracellular vesicles*) są zróżnicowaną populacją kulistych struktur otoczonych podwójną błoną fosfolipidową. Ich skład biochemiczny jest ściśle zależny od rodzaju komórek, z których są uwalniane. Transportują one białka oraz kwasy nukleinowe, w tym mikroRNA (miRNA) i mogą modulować procesy zachodzące w komórkach docelowych. Pęcherzyki klasyfikujemy w oparciu o rozmiar na egzosomy (<100 nm) oraz mikropęcherzyki (>100 nm). Egzosomy powstają przede wszystkim w wyniku wpuklenia błony do światła późnych endosomów, tworząc tym samym struktury zwane ciałami wielopęcherzykowymi (MVBs, ang. *multivesicular bodies*). Istotną rolę w sortowaniu zawartości egzosomów odgrywa kompleks ESCRT (ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) składający się z czterech aktywnych podjednostek ESCRT-0, -I, -II, i -III. Dodatkowo białka z grupy Rab (Rab11, Rab27) zaangażowane są w fuzję błon i transport pęcherzyków. Biorąc pod rozwagę wyniki naszych ostatnich badań, w których ze światła macicy ciężarnych loszek wyizolowaliśmy EVs niosące miRNA, postanowiliśmy zlokalizować elementy szlaku

* Badania finansowane z grantu KNOW2015/CB/PRO1/27, w ramach Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”.

³ e-mail: m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

biogenezy EVs w tkankach błony śluzowej macicy (*endometrium*) oraz trofoblastach świni. Aby potwierdzić komórkową lokalizację białek będących komponentami kompleksu ESCRT oraz białek z grupy Rab zastosowano barwienie immunofluorescencyjne. Dodatkowo aby wykazać obecności MVBs i EVs w wyżej wymienionych tkankach wykonano obrazowanie przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Do badań wykorzystano materiał pochodzący od loszek ciężarnych będących w 12, 14, 16, 18 oraz 20 dniu ciąży [DP] (n=2 – 4/dzień).

Stosując mikroskopię elektronową udało się potwierdzić obecność MVBs i EVs w tkankach pobranych 12, 16 i 20DP. Zlokalizowano je zarówno w komórkach nabłonka powierzchniowego, jak i gruczołowego oraz w komórkach trofoblastu. Wraz z postępującą ciążą obserwowano nagromadzenie MVBs pod powierzchnią błony komórkowej komórek nabłonkowych oraz trofoblastu. Również gruczoły maciczne wykazywały wzrost aktywność sekrecyjnej, m.in. z udziałem EVs. Potwierdzono także obecność EVs na powierzchni komórek nabłonkowych i trofoblastu. Barwienia immunofluorescencyjne umożliwiły zlokalizowanie w *endometrium* i trofoblastach (12-18DP) białek należących do rodziny Rab, między innymi Rab11, Rab27A i Rab7B. W przypadku białek należących do kompleksu ESCRT tkanki specyficznie ekspresywały jedynie białko VPS37.

Lokalizacja białek zaangażowanych w powstawanie i uwalnianie EVs sugeruje dużą aktywność ścieżki biogenezy zarówno w *endometrium* oraz w tkankach pochodzenia zarodkowego, co zostało potwierdzone we wcześniejszych badaniach ekspresji genów. Nagromadzenie pęcherzyków w 12DP obserwowane zarówno w komórkach nabłonkowych *endometrium*, jak i komórkach trofoblastu oraz na ich powierzchni – może świadczyć o wzmożonej wymianie informacji molekularnej z udziałem EVs między zarodkiem a matką, na etapie matczynego rozpoznania ciąży.

Praktyczne zastosowanie ultrasonografii w ocenie rozwoju ciąży i wyznaczaniu terminu porodu u zwierząt towarzyszących*

P. Socha^{1,2}, T. Janowski¹

¹ *Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie, Polska.*

Potrzeba trafnego wyznaczeniem terminu porodu u suk i kotek, była impulsem do badań nad możliwościami pogłębionej kontroli ciąży u zwierząt towarzyszących. Najbardziej praktyczną metodą stosowaną w prognozowaniu terminu porodu jest ultrasonograficzna biometria płodowa, polegająca na pomiarach wielkości wybranych struktur anatomicznych oraz części ciała płodu w badaniu USG. Następnie po zastosowaniu właściwych wzorów matematycznych uwzględniających masę ciała badanych osobników czy rasę dokonuje się wyliczenia spodziewanego terminu porodu. Metoda zakłada, że rozwój poszczególnych części i organów ciała płodów w czasie ciąży ma charakter liniowy i jest proporcjonalny. W toku dotychczasowych badań najbardziej przydatne z praktycznego punktu widzenia okazały się pomiary wewnętrznej średnicy jamy kosmówkowej – ICC oraz rozmiaru dwuciemniowego – BP.

W 3 doświadczeniach dokonano analizy skuteczności ICC i BP w prognozowaniu terminu porodu w zależności od zastosowanych wzorów w wybranych grupach psów i kotów. Sprawdzone skuteczność dotychczasowych wzorów oraz w wybranych przypadkach zaproponowano własne. Badania

* Funded by KNOW (Leading National Research Centre) Scientific Consortium “Healthy Animal – Safe Food”, decision of Ministry of Science and Higher Education No. 05-1/KNOW2/2015.

² e-mail: piotr.socha@uwm.edu.pl

polegały na regularnych kontrolach USG na etapach życia zarodkowego i płodowego. Grupa psów ras olbrzymich: 24 suki (12 ras), 30 pomiarów ICC i 24 BP. Zastosowano wzory Luvoni i Grioni (2000) dedykowane dla psów o średniej masie ciała. Uzyskana skuteczność prognozy: 54,16% (± 1 dzień, BP) i 90% (± 2 dni, ICC). Krzywe regresji ICC i BP uzyskane z wyników własnych były bliskie krzywym Luvoni i Grioni (2000) dla ras średnich. Może sugerować to podobne tempo wzrostu płodów ras średnich (10-25 kg) i olbrzymich. Rasa owczarek niemiecki: poddano analizie skuteczność 3 znanych dotąd wzorów dla ICC i BP dedykowanych tej rasie. Zbadano 34 suki; 53 pomiary ICC i 42 pomiary BP. Porównano skuteczność wzorów oraz porównano krzywe regresji. Wzór Luvoni and Grioni (2000) dla ICC był najskuteczniejszy (± 2 dni, 92,5%); przy pomiarach BP – wzór Groppetti et al. (2015) (± 2 dni, 95,2%). W badaniach psów ras miniaturowych: 24 suki ≤ 5 kg, 6 ras. Analiza krzywych wzrostu ICC i BP oraz zaproponowanie wzorów dla ICC i BP służących wyznaczaniu terminu porodu. Dokonano pomiaru 25 ICC i 22 BP. Rozmiar ICC wahał się między 3,13 do 31,15 mm od 41 do 26 dni przed porodem, a BP od 9,77 do 22,10 mm między 23 a 6 dniem przed porodem. Ukazano istotną statystycznie relację między wzrostem ICC i BP a czasem do porodu. Uzyskane wzory mogą mieć zastosowanie praktyczne: $y = (0,62887 \times \text{ICC}) - 44,04$ $y = (1,6190 \times \text{BP}) - 39,70$.

Zmiany w behawiorze krów jako wskaźnik ich zdrowotności*

G. Grodkowski¹, K. Puppel², T. Sakowski¹

¹ Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, Polska

² Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Zakład Hodowli Bydła, Warszawa, Polska

Celem pracy było porównanie oraz zbadanie zmian behawioralnych występujących u krów cierpiących na kulawizny oraz kliniczną i podkliniczną postać zapalenia wymienia.

W ostatnich latach w sektorze mleczarskim coraz mocniej zauważalna staje się tendencja związana z koncentracją produkcji. Niestety w dużych stadach problematyczne jest wczesne wykrywanie krów chorych, z zapaleniem wymienia czy problemami lokomocyjnymi. Bardzo pomocna we wczesnym diagnozowaniu tych schorzeń może być obserwacja behawioru krów. W zależności od ich typu krowa może wykazywać zmniejszony apetyt, czy skłonność do dłuższego odpoczynku. Bydło z rozwijającą się kulawizną rzadziej przyjmuje pozycje stojącą, a więc krócej pobiera paszę. Natomiast krowa z zapaleniem wymienia z powodu obrzęku więcej czasu spędza w pozycji leżącej.

Do doświadczenia wybrano 50 krów rasy brunatnej szwajcarskiej oraz 60 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Wytypowane zwierzęta były w różnym wieku i różnym stadium laktacji. W sezonie letnim krowy przez całą dobę przebywały na pastwisku, schodząc do obory jedynie na czas doju. Natomiast w sezonie zimowym bydło było utrzymywane w oborze wolnostanowiskowej. Wszystkie wybrane do doświadczenia krowy wyposażono w system pozwalający monitorować ich behawior, czas spędzany na:

* The authors acknowledge the financial support for this project provided by transnational funding bodies, being partners of the FP7 ERA-net project, CORE Organic Plus, and the cofund from the European Commission.

przeżuwanii, pobieraniu paszy, odpoczynku i aktywności fizycznej. Informacje o stanie zdrowia zwierząt zostały pobrane ze szczegółowych raportów weterynaryjnych oraz dokumentacji gospodarstwa.

W trakcie trwania doświadczenia odnotowano 17 krów z problemami układu lokomotorycznego, 13 z kliniczną oraz 42 sztuki z podkliniczną postacią zapalenia wymienia. Wykazano, że u krów z kulawiznami okres pobierania paszy był krótszy o około 115 min, natomiast okres odpoczynku był dłuższy o 125 min w porównaniu ze sztukami zdrowymi. Niższe pobranie suchej masy w bezpośredni sposób związane było również z obniżeniem wydajności o 1,5 kg/dzień. Krowy z kliniczną postacią zapalenia wymienia o 72 min. krócej pobierały paszę oraz o 77 min. dłużej odpoczywały w porównaniu do krów zdrowych. Zaobserwowano również spadek produkcji dobowej mleka o 4 kg. Wykazano także istotne zmiany w behawiorze krów z podkliniczną postacią zapalenia wymienia. Krowy te o 23 min. mniej czasu spędzały na pobieraniu paszy i o 20 min. dłużej odpoczywały w porównaniu do zwierząt zdrowych. We wszystkich przypadkach nie wykazano różnic w czasie spędzonym przez krowy na przeżuwanii.

Wpływ inuliny na rozwój kości

M. Sobol^{1,2}, S. Raj¹, G. Skiba¹

¹ Zakład Żywienia Zwierząt, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN, Polska

Spożywanie wysokotłuszczowej diety bogatej w nasycone kwasy tłuszczowe pogorsza właściwości kości, a w konsekwencji może powodować osteoporozę nawet w młodym wieku. Jednym ze sposobów poprawy właściwości kości może być suplementacja inuliną. Inulina jest probiotykiem, który wpływa na skład mikroflory jelitowej i stymuluje wzrost *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus*, które zwiększają tworzenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Kwasy te bezpośrednio przyczyniają się do zwiększenia absorpcji Ca, Mg i Fe w jelitach. Niektóre badania sugerują, że podawanie inuliny zwierzętom może zwiększyć wchłanianie składników mineralnych i pozytywnie wpłynąć na jakość kości; jednak badania te zostały przeprowadzone wyłącznie na gryzoniach karmionych dietą standardową.

Głównym celem prezentowanego doświadczenia było określenie wpływu inuliny na właściwości kości świń żywionych dietą wysokotłuszczową bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe, o niebilansowanej proporcji lizyny do energii metabolicznej. W 50. dniu życia 21 świń przydzielono losowo do 3 grup: kontrolnej (C) żywionej dietą standardową, dwóch doświadczalnych (T, T+I) żywionych dietą wysokotłuszczową bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe. Świnie z grupy T+I otrzymywały dodatkowo inulinę w ilości 7% dziennego spożycia paszy. W 120. dniu życia świnie zostały poddane sedacji w celu oznaczenia w całym ciele zawartości składników mineralnych i gęstości mineralnej kości przy użyciu densytometru NORLAND. Po wykonaniu analizy densytometrycznej świnie zostały ubite. Z prawej półtuszy pobrano kość

² e-mail: m.sobol@ifzz.pl

udową w celu określenia właściwości morfometrycznych, geometrycznych, densytometrycznych i wytrzymałościowych.

Świnie z grupy T+I miały o około 7% większe przyrosty dzienne i o około 5% wyższą końcową masę ciała w porównaniu do świń z grup C i T (odpowiednio 896 vs średnio 840 g i 74,7 vs średnio 71,2 kg, $P < 0,05$). Świnie z grup T i T+I pobrały łącznie średnio 114,8 kg paszy, a świnie z grupy C 124 kg paszy ($P < 0,05$), jednak łączne pobranie energii z paszy nie różniło się pomiędzy grupami. Świnie z grupy T+I pobrały 8 kg inuliny, która wniosła dodatkowe 50,4 MJ EM. Łączna ilość pobranej lizyny wynosiła w grupach T i T+I 0,78 kg, a w grupie C 1,22 kg. Zawartość składników mineralnych i gęstość mineralna kości w całym ciele świń były wyższe w grupach T+I i C niż w grupie T (odpowiednio średnio 1781,3 vs 1641,1 g, $P < 0,01$ i 0,990 vs 0,936 g/cm², $P < 0,05$). Właściwości kości udowej przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Właściwości kości udowej.

Cechy	Grupa		
	C	T	T+I
Masa, g	255,3 (±2,30)	245,9 (±2,20)	251,5 (±4,21)
Długość, cm	17,54 (±0,38)	17,64 (±0,23)	17,68 (±0,48)
Zawartość składników mineralnych, g	67,98 ^B (±2,41)	62,02 ^A (±1,30)	65,48 ^B (±1,58)
Gęstość mineralna kości, g/cm ²	1,053 ^C (±0,013)	0,976 ^A (±0,020)	1,022 ^B (±0,020)
Wytrzymałość kości, N	430,3 ^B (±28,44)	368,1 ^A (±32,24)	420,6 ^B (±20,80)
Maksymalna siła odkształcająca, N	349,0 ^C (±15,90)	276,5 ^A (±20,31)	320,9 ^B (±15,00)
Powierzchnia korowa, mm ²	347,9 (±34,19)	318,5 (±21,11)	297,8 (±23,10)
Grubość warstwy korowej, mm	5,73 ^B (±0,42)	5,22 ^A (±0,14)	5,13 ^A (±0,16)
Wskaźnik korowo-trzonowy, %	45,8 ^b (±1,78)	42,3 ^a (±1,64)	43,5 ^{ab} (±2,18)

A, B, C – różnice istotne na poziomie $P < 0,01$;

a, b – różnice istotne na poziomie $P < 0,05$.

Podsumowując, suplementacja inuliny do wysokotłuszczowej diety bogatej w nasycone kwasy tłuszczowe zmniejszyła negatywny wpływ takiej diety na stopień zmineralizowania i wytrzymałość kości udowej rosnących świń.

Wykorzystanie innowacyjnej suplementacji prosiąt żelazem w zapobieganiu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza oraz jej wpływ na rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń*

M. Szudzik¹, A. Jończy¹, R. Mazgaj¹,
E. Smuda¹, P. Lipiński¹, R.R. Starzyński¹

¹ Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, Polska

W projekcie podjęta została próba oszacowania długoterminowego (do momentu uboju) wpływu innowacyjnej suplementacji żelazem, na metabolizm żelaza w wątrobie i mięśniach, ich rozwój ontogenetyczny oraz na jakość poubojową tuszy. Związana z niedoborem żelaza niedokrwistość prosiąt w okresie neonatalnym jest zaburzeniem, które w zróżnicowanym natężeniu występuje powszechnie u prosiąt wszystkich ras. Rutynowo stosowana suplementacja prosiąt dekstranem żelaza (DexFe) wiąże się z niekorzystnymi fizjologicznie mechanizmami wchłaniania i reutilizacji tego mikroelementu. Nasze badania z wykorzystaniem żelaza hemowego w suplementacji prosiąt *per os* w połączeniu z parenteralnym podaniem niskiej, nietoksycznej dawki DexFe wykazują korzystny wpływ tej nowatorskiej suplementacji w leczeniu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza przy jednoczesnym wyeliminowaniu jego toksyczności. Doświadczenie przeprowadzono na prosiątach dwóch ras: 990 i WBP. Prosięta podzielono na 2 grupy w obrębie każdej z dwóch ras – iniekcja DexFe 100 mg Fe/kg m.c. w 3 dniu po urodzeniu (tradycyjna

* Projekt promotorski w ramach Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, umowa nr KNOW/IGHZ/RMK/PhD/2016/01, 1.09.2016-1.09.2019.

suplementacja, grupa kontrolna) lub iniekcja 40 mg Fe/kg m.c. w 3 dniu życia, oraz pasza z dodatkiem liofilizowanej hemoglobiny bydłowej w ilości 38 g Hb/kg (612 mg Fe/kg) od 5 do 45 dnia życia (grupa eksperymentalna, suplementacja mieszana). Pobrano krew, wątrobę, śledzionę, nerkę, mięsień szeroki grzbietu (*latissimus dorsi*) i mięsień pośladkowy wielki (*gluteus maximus*). W pobranym materiale badawczym oznaczono morfologię krwi, parametry biochemiczne żelaza, monitorowano wykorzystanie i zużycie paszy oraz przyrosty masy ciała. W Stacji Kontroli Użytkowości Trzody Chlewnej należącej do Zakładu w Pawłowicach przeprowadzona została poubojowa ocena wartości rzeźnej świń. Wykazano, że zastosowanie nowatorskiej suplementacji żelazem chroni prosięta obydwu ras przed wystąpieniem niedokrwistości z niedoboru żelaza. Ponadto, status żelaza u prosiąt tak suplementowanych był zbliżony do grupy zwierząt traktowanych tradycyjną dawką DexFe. Jednakże, wykazano istotne statystycznie różnice międzyrasowe w poziomie zarówno żelaza hemowego jak i nie-hemowego w poszczególnych tkankach. W odróżnieniu od zwierząt nastrzykiwanych DexFe, w grupie zwierząt suplementowanych dodatkiem Hb w obrębie obydwu ras odnotowano nieznaczny spadek wartości rzeźnych, silniej wyrażony u mięsnej linii 990. Podsumowując wyniki naszych badań po raz pierwszy wskazują na możliwość wykorzystania łączonej suplementacji żelaza w odchowie i tuczu prosiąt.

Rola neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w modulacji podwzgórzowej sieci regulującej apetyt*

B.J. Przybył¹, M. Szlis¹, A. Wójcik-Gładysz^{1, 2}

¹ Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN, Polska

Badania wykazały, że neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), należący do rodziny neurotrofin, uczestniczy w mechanizmach, które promują przeżycie neuronów. Występowanie mRNA i białka BDNF stwierdzono w obszarach podwzgórza odpowiedzialnych za regulację pobierania pokarmu oraz integrację informacji o stanie energetycznym organizmu na poziomie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Dużą aktywność tego neurohormonu zaobserwowano zarówno u zwierząt, jak i u ludzi wykazujących objawy różnego rodzaju uzależnień żywieniowych, w tym u pacjentów cierpiących na anoreksję czy bulimię. Celem przedstawionych badań było poznanie mechanizmu działania BDNF i jego wpływu na procesy regulacji homeostazy energetycznej organizmu. Hipoteza badawcza zakłada, że BDNF jest włączony w modulację aktywności neuronów neuropeptydu Y (NPY), białka agouti (AgRP), transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART) oraz α -melanokortyny (α MSH), współtworzących podwzgórzową neurohormonalną sieć regulującą łaknienie oraz, że BDNF modyfikuje

* Doświadczenie na zwierzętach sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant PRE-LUDIUM 9, nr 2015/17/N/NZ9/01110; przeprowadzone analizy sfinansowano z „Grantu na start” przyznanych przez Dyrektora Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk.

² e-mail: a.wojcik@ifzz.pl

ekspresję wybranych mikroRNA (miRNA) w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu (MBH) owcy.

W celu zweryfikowania hipotezy badawczej wykonano doświadczenie na dojrzałych płciowo owcach rasy Merynos Polski (n = 24). Przed rozpoczęciem doświadczenia wszystkim zwierzętom zaimplantowano stalowe kaniule prowadzące do trzeciej komory mózgu przy pomocy metody stereotaktycznej. Przed rozpoczęciem głównego eksperymentu u owiec przeprowadzono synchronizację rui. Podczas fazy lutealnej cyklu rujowego u owiec (8-10 dzień cyklu), przez trzy kolejne dni wykonano następujące rodzaje infuzji do trzeciej komory mózgu:

1. Roztwór Ringera-Locke'a 480 µl /dzień (grupa kontrolna; n = 8)
2. BDNF w dawce 10 µg /480 µl /dzień (grupa eksperymentalna I; n = 8)
3. BDNF w dawce 60 µg /480 µl /dzień (grupa eksperymentalna II; n = 8)

Każdego dnia wykonywano cztery 50-minutowe infuzje rozdzielone 30-minutowymi przerwami. Bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia owce uśmiercono w celu pozyskania wybranych struktur podwzgórza do oznaczenia ekspresji mRNA (*npy*, *agrp*, *cart*, *pomc*, *pam*) metodą Real-Time qPCR. Wykonane zostało również profilowanie ekspresji miRNA mogących uczestniczyć w regulacji aktywności neuronów NPY/AgRP oraz CART/α-MSH.

Stwierdzono, że BDNF powoduje zależny od dawki wzrost ekspresji mRNA *npy* i *agrp* w MBH. Ponadto BDNF obniżył ekspresję mRNA *cart* oraz *pam* przy równoczesnym wzroście ekspresji mRNA *pomc*. Wykazano również, że BDNF wpłynął na zmiany w ekspresji wybranych miRNA w MBH.

Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że BDNF moduluje funkcjonowanie procesów związanych z regulacją homeostazy energetycznej organizmu poprzez zmiany w ekspresji mRNA *npy*, *agrp*, *cart*, *pomc* oraz *pam*, a także może modyfikować ekspresję wybranych miRNA w MBH owcy.

Wpływ preparatu wytłokowego z malin na syntezę oraz profil kwasów żółciowych w treści jelita ślepego szczurów Wistar*

B. Fotschki¹ϕ, J. Juśkiewicz¹, A. Jurgoński¹, N. Rigby^{3,4}, M. Sójka²,
K. Kołodziejczyk², A. Mackie^{3,4}, Z. Zduńczyk¹

¹ Zakład Biologicznych Funkcji Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Polska

² Instytut Technologii i Analizy Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

³ Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom

⁴ School of Food Science & Nutrition, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

Jednym z czynników zwiększających ryzyko występowania stanów zapalnych i indukcji procesów kancerogenezy w przewodzie pokarmowym jest nadmierna zawartość w treści jelita wtórnych kwasów żółciowych, m.in. deoksycholowego (DCA) i lithocholowego (LCA). W przeciwdziałaniu temu zjawisku, indukowanemu dietą bogatą w tłuszcze, mogą być przydatne zabiegi żywieniowe skutkujące obniżeniem poziomu cholesterolu we krwi i wtórnych kwasów żółciowych w treści jelit oraz regulacja syntezy kwasów żółciowych w wątrobie. Wyniki dotychczasowych badań uzasadniają hipotezę, że takie właściwości mogą wykazywać biologiczne aktywne związki, występujące w produktach ubocznych przetwórstwa niektórych owoców, m.in. malin. Znaczącą część produktu ubocznego przetwórstwa malin stanowią nasiona (ok. 70%) charakteryzujące się wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT). Wiele badań przedstawia prozdrowotne

* Badania finansowane z Grantu nr UMO-2014/15/N/NZ9/02425 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

ϕ e-mail: b.fotschki@pan.olsztyn.pl

działanie WNKT związane z poprawą profilu lipidowego, regulacją syntezy kwasów żółciowych oraz wskaźników stanu zapalnego w wątrobie. Niestety wszystkie związki obecne w nasionach najczęściej przechodzą przez układ trawienny w stanie nienaruszonym wpływając na obniżenie wartości biologicznej wyłoków z malin. Celem eksperymentu było zbadanie możliwości zwiększenia prozdrowotnych właściwości wyłoków z malin poprzez drobnoziarniste rozdrobnienie i/lub frakcjonowanie miąższu i nasion.

Doświadczenie żywieniowe zostało wykonane na szczurach Wistar podzielonych na 6 grup po 8 osobników tj. grupa ze standardową dietą dla gryzoni laboratoryjnych (C), grupa z dietą wysokotłuszczową (HF) oraz 4 grupy zwierząt z dietą HF wzbogaconą 7% dodatkiem różnych rodzajów wyłoków malinowych: natywne wyłoki rozdrobnione standardowo (HFSGS), natywne wyłoki o drobnoziarnistym rozdrobnieniu (HFNGS), wyłoki pozbawione nasion o rozdrobnieniu standardowym (HFSG) oraz drobnoziarnistym (HFNG).

Po 8 tygodniach żywienia zwierząt dietą HF odnotowano charakterystyczne zaburzenia w profilu kwasów żółciowych (BA) w treści jelita ślepego oraz parametrach funkcjonowania wątroby. Dodatek do diety HF drobno zmielonych nasywnych wyłoków malinowych obniżyło stężenie amoniaku oraz wpłynęło korzystnie na metabolizm BA zmniejszając stężenie wtórnych kwasów żółciowych tj. DCA i LCA w treści jelita ślepego. Dodatkowo, ten sam preparat malinowy obniżył stężenie cholesterolu i BA w wątrobie. Obserwowane zmiany w syntezie BA oraz metabolizmie lipidów mogły być związane ze znaczącym zmniejszeniem poziomu ekspresji białek FGF19, FGFR4 oraz PPAR α w wątrobie. Odwrotny efekt odnotowano gdy do diety HF dodano drobno zmielony beznasienny wyłok malinowy. Dieta HFNG nie zmieniła stężenia amoniaku oraz nie wpłynęła znacząco na zmniejszenie syntezy wtórnych kwasów żółciowych w treści jelita ślepego. W wątrobie zwierząt żywionych dietą HFNG odnotowano zwiększoną ekspresję SHP będącego jednym z głównych białek regulujących syntezę BA. Podsumowując, obecność nasion i poziom zmielenia wyłoków malinowych miały znaczący wpływ na profil BA w treści jelita ślepego oraz syntezę BA w wątrobie szczurów żywionych dietą HF. Najniższe stężenie wtórnych kwasów żółciowych w treści jelita ślepego odnotowano u zwierząt żywionych dietą z drobno zmielonymi nasywnymi wyłokami malinowymi.

Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do wizualizacji biofilmu w przewodzie pokarmowym kurcząt żywionych dietami z dodatkiem probiotyku*

P. Konieczka^{1,2}, K. Nowicka¹, S. Smulikowska¹

¹ Zakład Żywienia Zwierząt, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN, Polska

Skład i aktywność mikroflory bakteryjnej oddziałuje na stan funkcjonalny przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów. Występujące w mieszankach paszowych polisacharydy nieskrobiowe (NSP) nie są trawione przez kurczęta, ale zmieniają aktywność fermentacyjną w końcowych odcinkach przewodu pokarmowego. Wprowadzanie do diet kurcząt enzymów powodujących rozkład NSP przyczynia się do zwiększenia dostępności składników pokarmowych, natomiast użycie probiotyków powoduje korzystne zmiany w składzie mikroflory bakteryjnej. Jednak o skuteczności probiotyków decyduje w dużej mierze stopień zasiedlenia oraz zdolność wytworzenia strukturalnego biofilmu przez symbiotyczne szczepy bakterii w przewodzie pokarmowym, gdyż ogranicza to możliwość kolonizacji tego środowiska przez bakterie patogenne.

Celem badań było określenie aktywności mikroflory bakteryjnej oraz wizualizacja biofilmu w różnych odcinkach przewodu pokarmowego u kurcząt żywionych dietami z dodatkiem enzymu oraz probiotyku.

* Badania finansowane z projektu „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju” przyznanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

² e-mail: p.konieczka@ifzz.pl

Przygotowano diety eksperymentalne (pszeniczno-sojowe z dodatkiem grochu; 250 g/kg) oraz dietę kontrolną bez dodatku grochu. Do diet eksperymentalnych dodawano enzym z grupy karbohydraz, probiotyk (spory bakterii *Bacillus subtilis*) lub oba dodatki. Diety podawano kurczętom Ross 308 utrzymywanych indywidualnie w klatkach metabolicznych w okresie od 9. do 28. dnia życia. W 29. dniu życia od kurcząt pobrano treść z jelita biodrowego oraz treść z jelit ślepych do oznaczeń koncentracji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz aktywności glikolitycznych enzymów bakteryjnych. Od kurcząt pobrano wycinek wola, dwunastnicy, jelita cienkiego, jelita biodrowego oraz jelita ślepego do wizualizacji biofilmu przy wykorzystaniu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Histo-FISH).

Dodatek probiotyku spowodował pogorszenie współczynnika wykorzystania paszy u kurcząt, natomiast dodatek enzymu częściowo niwelował ten efekt. Wprowadzenie nasion grochu do diet nie wpłynęło istotnie na koncentrację SCFA w jelitach ślepych ale zwiększyło tę koncentrację w jelicie biodrowym. Aktywność 2 enzymów bakteryjnych w jelicie biodrowym i 4 enzymów bakteryjnych w jelitach ślepych była niższa u tych kurcząt w porównaniu do kontroli. Dodatek probiotyku do diet korzystnie wpływał na tworzenie biofilmu przez bakterie *Bacillus subtilis* w przewodzie pokarmowym ptaków: w wolu i dwunastnicy bakterie były zlokalizowane w formie agregatów przylegających do części paszy, w jelicie cienkim i biodrowym zaobserwowano tworzące się struktury biofilmu przylegające do warstwy wydzielniczej, natomiast w pełni strukturalny biofilm bakterii *Bacillus subtilis* przylegający do kosmków jelitowych stwierdzono w jelicie ślepym.

Wyniki wskazują, że dodatek enzymu oraz probiotyku do diet zawierających nasiona grochu nie zwiększa istotnie fermentacji w końcowych odcinkach jelita u kurcząt, jednak w różnym stopniu oddziałuje na aktywność mikroflory bakteryjnej w jelicie biodrowym oraz w jelitach ślepych. Dodatek probiotyku do diet wspomaga tworzenie biofilmu przez bakterie *Bacillus subtilis* w przewodzie pokarmowym ptaków.

**SESJA
PLENARNA II**

Zmienność wirusa grypy ptaków i jej wpływ na przebieg zakażeń i epidemiologię grypy u drobiu i ptaków dzikich*

K. Śmietanka¹, E. Świętoń

Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Polska

Wirusy grypy cechuje duża zmienność, wynikająca z dwóch mechanizmów. Po pierwsze, podczas replikacji powstaje wiele nieznacznie różniących się od siebie wariantów genetycznych wirusa (określanych jako *quasispecies*), których wzajemne proporcje zależą od aktualnych wartości przystosowawczych poszczególnych fenotypów wygenerowanych w wyniku mutacji. Podczas zmiany warunków środowiska (np. nowy gospodarz, stosowanie chemioterapeutyków, itp.), w rezultacie naturalnej selekcji, najlepiej dostosowany wariant fenotypowy zaczyna dominować. Przykładem gwałtownej zmiany właściwości biologicznych wirusa grypy ptaków jest mutacja w genie hemaglutyniny (HA) prowadząca do transformacji zjadliwości z niskiej (LPAI – grypa ptaków o niskiej zjadliwości) do wysokiej (HPAI – grypa ptaków o wysokiej zjadliwości). Interesującym, chociaż słabo poznanym zjawiskiem, jest efekt „wąskiego gardła” (ang. „bottleneck”), polegający na gwałtownym spadku zróżnicowania genetycznego wirusa grypy podczas transmisji zakażeń z jednego organizmu na drugi. Wykazano to w eksperymentalnych badaniach własnych w odniesieniu do wirusa LPAI pochodzącego od indyków i pasażowanego na kurach. Wyjaśnieniem fenomenu „wąskiego gardła” w tym

* Badania częściowo finansowane z grantów Narodowego Centrum Nauki (2015/17/N/NZ6/03515 i 2016/21/B/NZ6/01258).

¹ e-mail: ksmiet@piwet.pulawy.pl

przypadku jest pojawianie się wariantów wirusa o coraz lepszym stopniu adaptacji do nowego gospodarza, które w określonym momencie, w rezultacie selekcji naturalnej, zaczynają dominować, zwiększając homogenność genetyczną populacji. Wykazano również, że na poziom zróżnicowania genetycznego wirusów grypy wpływa gatunek gospodarza. Dla przykładu, w eksperymentalnym zakażeniu przepiórek, indyków i kaczek tą samą wyjściową zawiesiną wirusa LPAI stwierdzono największy stopień heterogenności wirusa u przepiórek i prawie niezauważalny u kaczek, przy czym zróżnicowanie dotyczyło głównie genu HA.

Drugi mechanizm zmienności wynika z faktu posiadania przez wirusy grypy segmentowanego genomu, przez co może dochodzić do ich wymiany pomiędzy wirusami różnego pochodzenia, zakażającymi organizm w tym samym czasie. Proces ten nosi nazwę reasortacji genetycznej. Powstające w ten sposób warianty wirusa w sposób nagły zmieniają swoje właściwości biologiczne. Przykładem są wirusy HPAI podtypu H5 z tzw. kładu 2.3.4.4, które powstały w wyniku reasortacji pomiędzy wirusami HPAI podtypu H5N1, występującymi endemicznie u drobiu w Azji, a wirusami LPAI różnych podtypów, krążącymi u dzikich ptaków wodnych. Posiadają one również „mieszankę” cech wirusów „rodzicielskich”: z jednej strony wykazują wysoką zjadliwość dla wielu gatunków ptaków dzikich i drobiu, a z drugiej strony posiadają dość wysoki poziom adaptacji do organizmu niektórych gatunków ptaków blaszkodziobych, umożliwiającą ich międzykontynentalną transmisję. Wirusy H5 kładu 2.3.4.4 wywołały w latach 2014-2018 duże epidemie HPAI u drobiu i dzikich ptaków w Europie i Azji (głównie podtypy H5N8, H5N6 i H5N5) oraz Ameryce Północnej (głównie podtyp H5N2). W Polsce w latach 2016/2017 stwierdzono obecność 65 ognisk u drobiu i 68 u ptaków dzikich, w zdecydowanej większości wywołanych przez wirus podtypu H5N8, w dwóch przypadkach również wirus podtypu H5N5.

Zastosowanie rekombinowanego białka kapsydu cirkowirusa gołębiego do oceny seroprewalencji PiCV u gołębi reprodukcyjnych oraz pobudzania swoistej odporności przeciwko temu wirusowi*

T. Stenzel¹

Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

Jednym z większych problemów zdrowotnych w hodowli gołębi są zespoły chorobowe będące następstwem immunosupresji o tle zakaźnym. Za prawdopodobny zakaźny czynnik immunosupresyjny u tych ptaków uważany jest cirkowirus gołębi (Pigeon Circovirus, PiCV). Zakażenia tym wirusem są szeroko rozpowszechnione w całym świecie. Za przyczynę szybkiego rozprzestrzeniania się PiCV w populacji gołębi należy uznać przede wszystkim międzynarodowe loty konkursowe gołębi pocztowych oraz międzykontynentalny handel tymi ptakami. PiCV uważany jest również za główny czynnik zakaźny wywołujący tzw. Zespół Choroby Gołębi Młodych (Young Pigeons Disease Syndrome, YPDS).

Aktualnie zakażenia wywołane przez PiCV diagnozowane są głównie za pomocą metod biologii molekularnej, jednak w przypadku próbek pobranych przyżyciowo często uzyskuje się wyniki fałszywie ujemne w testach PCR. Profilaktyka jak i diagnostyka zakażeń PiCV są słabo opracowane ze względu

* Badania finansowane z Grantu nr 2014/15/D/NZ6/02416 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, a doświadczenia z wykorzystaniem gołębi przeprowadzono za zgodą LKE w Olsztynie nr 64/2014.

¹ e-mail: tomasz.stenzel@uwm.edu.pl

na brak możliwości namnażania tego wirusa w warunkach laboratoryjnych, co jest przyczyną braku serologicznych testów diagnostycznych oraz skutecznych szczepionek.

W związku z powyższym podjęto badania mające na celu próbę opracowania testu serologicznego z użyciem rekombinowanego białka kapsydu (rCP) PiCV jako antygeny diagnostycznego. Antygen ten wykorzystano również do immunizacji ptaków celem oceny reakcji układu odpornościowego na jego podanie.

Antygen uzyskano poprzez klonowanie do plazmidu ekspresyjnego pET6xHN-N pełnej sekwencji *cap* krajowego izolatu PiCV należącego do szczepu PL-53 wykrytego i opisanego przez autora w 2014r. Gen CP transformowano do bakterii *E. coli* szczepu BL21 (DE3) Rosetta blue metodą szoku termicznego. Indukcję nadekspresji rCP wywoływano poprzez dodanie IPTG do płynnej hodowli bakterii. Po 16 godzinach hodowli zawiesinę bakterii wirowano i oczyszczano białko metodą chromatografii powinowactwa przy użyciu kolumn zawierających złoża niklowe. Antygenowość uzyskanego białka określano metodą Dot Blot. Tak uzyskany antygen wykorzystano do opracowania testu in-house ELISA i badań metodą ELISPOT oraz do immunizacji ptaków doświadczalnych.

Wyniki badań serologicznych stad reprodukcyjnych wykazały, że większość przebadanych ptaków posiadała przeciwciała (średnio 71,92% bez względu na status zakażenia PiCV). Wartość S/P różniła się statystycznie ($p \leq 0,01$) i wynosiła 0,48 i 0,28, przy czym wartość wyższą stwierdzono u ptaków podklinicznie zakażonych PiCV.

Wyniki badań serologicznych ptaków immunizowanych rCP wykazały wyraźny wzrost ilości przeciwciał IgG u gołębi szczepionych (średnie OD = 3,92) w porównaniu do grupy kontrolnej (średnie OD = 1,8) pod koniec eksperymentu (60 dni od pierwszej immunizacji). Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku swoiście uczulonych limfocytów B (limfocyty B pamięci immunologicznej), których bezwzględna liczba była najwyższa po pierwszym szczepieniu (wartości bezwzględne 230,48 oraz 58,67 odpowiednio u ptaków szczepionych i nieszczepionych) i stopniowo spadała do końca trwania eksperymentu.

Reasumując powyższe należy stwierdzić, że opracowany antygen może być z powodzeniem stosowany w diagnostyce serologicznej zakażeń PiCV do oceny swoistej odporności humoralnej i komórkowej w warunkach laboratoryjnych oraz może stanowić potencjalny antygen szczepionkowy, służący do swoistego uodporniania gołębi przeciwko PiCV.

SESJA II

**Badania epidemiologiczne zwierząt
gospodarskich, wolno żyjących oraz
środowiska**

Ocena występowania i charakterystyka molekularna koronawirusów w populacji dzikich ptaków w Polsce*

J. Miłek, K. Domańska-Blicharz¹

*Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach, Polska*

Koronawirusy (coronaviruses – CoVs) to wirusy o genomie RNA, wywołujące zachorowania u szerokiego spektrum gatunków ptaków i ssaków, w tym również u człowieka. Zgodnie z taksonomią, w obrębie podrodziny *Coronavirinae* wyróżnia się cztery rodzaje, z których gamma i deltakoronawirusy wykrywane są głównie u ptaków. W obrębie rodzaju *Gammacoronavirus* znajdują się patogeny stanowiące poważny problem w produkcji drobiarskiej tj. wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV), koronawirus indyków (TCoV) oraz koronawirus perliczek (GfCoV). Ponadto dotychczasowe dane dowodzą, iż CoVs występują również w populacji ptaków wolnożyjących jako infekcje subkliniczne. Biorąc pod uwagę duże zróżnicowanie gatunkowe ptaków oraz ich zdolności migracyjne podejrzewa się, iż pełnią one rolę rezerwuaru i źródła rozprzestrzeniania CoVs. Dlatego też ważnym aspektem w epidemiologii koronawirusów jest określenie prewalencji tych wirusów w populacji dzikich ptaków oraz ich charakterystyka.

W tym celu przebadano 2194 wymazów z kloaki (1494 – wymazy pojedyncze, 700 – wymazy pulowane po 5 od danego gatunku) pobierane od dzikich ptaków w ramach monitoringu grypy ptasiej prowadzonego na terenie całej Polski w latach 2009-2017. Do wykrywania koronawirusów zastosowano

* Badania finansowane z Grantu KNOW nr KNOW2015/CB/PRO1/33.

¹ e-mail: domanska@piwet.pulawy.pl

metody RT-PCR/nested PCR, w których użyte startery były komplementarne do fragmentu genu wirusowej polimerazy. Uzyskane sekwencje poddano analizie filogenetycznej z wykorzystaniem programów BioEdit 7.2.5. oraz MEGA v7.

W przebadanym materiale obecność koronawirusów stwierdzono w 60 pojedynczych wymazach (4%) i w 83 spulowanych próbach (11,9%). Przeprowadzona analiza filogenetyczna wykazała, iż wykryte CoVs należą do rodzaju *Gamma*- jak również *Deltacoronavirus*. Wyższy odsetek, 5,7% stanowiły gammaCoV (125 prób dodatnich), natomiast deltaCoV – 0,8% (17 prób dodatnich). W przeważającej większości wykryte gammaCoV izolowano od ptaków blaszkodziobych (*Anseriformes*) tj. kaczka krzyżówka, kaczka cyranka, łabędź niemy, gęś gęgawa oraz gęś zbożowa, a także siewkowych (*Charadriiformes*): mewa śmieszka, siwa i srebrzysta, żurawiowych (*Gruiformes*): łyska zwyczajna, gołębiowych (*Columbiformes*): gołąb miejski i pocztowy i u jednego gatunku (bażant) z rzędu grzebiących (*Galliformes*). GammaCoV wykryte u gęsi zbożowej (ACoV/Bean goose/PL-Mw51/09) i bażanta (ACoV/Pheasant/Pl-Mw56/12A) wykazywały dużą homologię do TCoV i IBV występujących u drobiu. Rodzaj *Deltacoronavirus* zidentyfikowano u gatunków z rzędu siewkowych (mewa śmieszka, mewa siwa, rybitwa rzeczna, kszyc), a także w pojedynczych próbach pochodzących od bażanta i kormorana (*Suliformes*). Co ciekawe, deltaCoV bażanta (ACoV/Pheasant/PL-Mw378/09B) wykazał bliskie pokrewieństwo do deltakoronawirusów występującego u świń (JQ065043), wróbla (JQ065045) oraz kota bengalskiego (EF584908).

Uzyskane wyniki potwierdzają, iż dzikie ptaki infekowane są zarówno przez gamma- jak i deltakoronawirusy, chociaż ich prevalencja nie jest wysoka. Porównując obie grupy wykrytych CoVs można zaobserwować znaczne zróżnicowanie w zakresie gospodarza w przypadku gammaCoV, z kolei deltakoronawirusy wykazywały wyższą specyficzność gatunkową. Ponadto, wykrycie u gęsi zbożowej i bażanta gammaCoVs blisko spokrewnionych z TCoV i IBV sugeruje, że ptaki wolnożyjące biorą udział w rozprzestrzenianiu tych wirusów do populacji drobiu.

Zastosowanie HRMA do oceny korelacji między polimorfizmem genu *ail* a biotypem szczepów *Yersinia enterocolitica**

A. Bancercz-Kisiel^{1,3}, A. Szczerba-Turek¹, A. Platt-Samoraj¹,
M. Michalczyk², W. Szweda¹

¹ Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

² Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

Istotnym chromosomalnym markerem zjadliwości *Yersinia (Y.) enterocolitica* jest gen *ail*, kodujący produkcję białka Ail (attachment invasion locus) – polipeptydu o masie 17 kDa, odgrywającego istotną rolę we wstępnych etapach zakażenia. Celem badań była ocena występowania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP – single nucleotide polymorphism) w amplikonach genu *ail* szczepów *Y. enterocolitica* należących do różnych biotypów. Materiał badawczy stanowiło 227 szczepów *Y. enterocolitica* należących do różnych biotypów: 10 *ail*-pozytywnych szczepów biotypu 1A, 13 szczepów biotypu 1B, 21 szczepów biotypu 2 oraz 183 szczepy biotypu 4. Analizowano zarówno szczepy pochodzące z potwierdzonych klinicznie przypadków jersiniozy u ludzi, jak również szczepy wyizolowane od zwierząt niewykazujących objawów charakterystycznych dla jersiniozy.

SNP wykrywano w badanych sekwencjach genu *ail* przy użyciu Corbett Rotor-Gene 6000™ z funkcją HRM (High Resolution Melting). Otrzymane

* Sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015, konkurs ESR3.

³ e-mail: a.bancercz-kisiel@uwm.edu.pl

wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene HRM, klasyfikującego badane amplikony do poszczególnych genotypów. Analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów genu *ail* umożliwiła zidentyfikowanie 3 genotypów: 1A, 1B, 2/4 oraz 3 wariacji. Analiza sekwencji genu *ail* szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1B (genotyp 1B) ujawniła 99,8% podobieństwa pomiędzy badanymi sekwencjami nukleotydowymi a wzorcową sekwencją *Y. enterocolitica* AM286415 – wykryto tylko jedną mutację, tranzycję G2007848T. Natomiast analiza szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A (genotyp 1A) wykazała obecność dwóch SNP – tranzycji G2007848T i G2008088T. Analiza szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypów 2 i 4 (genotyp 2/4) ujawniła, że ich sekwencje nukleotydowe genu *ail* były identyczne w 100%. Jednak w porównaniu z *Y. enterocolitica* AM286415 charakteryzowały się obecnością aż 14 SNP. Bezpośrednie sekwencjonowanie wariacji wykazało, że wszystkie charakteryzowały się obecnością 14 SNPs, a zatem zostały zaliczone do genotypu 2/4.

Zastosowanie metody HRM do badania SNP w amplikonach genu *ail* umożliwiło wykazanie korelacji między polimorfizmem genu *ail* a biotypem badanego szczepu *Y. enterocolitica*. Analiza filogenetyczna przeprowadzona w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentów genu *ail* ujawniła bowiem obecność trzech różnych grup filogenetycznych, ściśle skorelowanych z biotypem szczepów, a niezależnych od źródła ich izolacji (ludzie lub zwierzęta). Pierwsza grupa składała się ze szczepów *Y. enterocolitica* należących do wysoce chorobotwórczego biotypu 1B, druga obejmowała niepatogenne szczepy biotypu 1A, a trzecia szczepy *Y. enterocolitica* należące do słabo patogennych biotypów 2 i 4. Opracowana metoda HRM, różnicująca niepatogenne, słabo patogene i wysoce patogene szczepy *Y. enterocolitica* może zatem stanowić alternatywę dla standardowego biotypowania, serotypowania, a następnie sekwencjonowania izolatów.

Wieloskładnikowa metoda wykrywania i oznaczania substancji przeciwbakteryjnych w paszach techniką LC-MS/MS

Ewelina Patyra¹, Carolina Nebot², Rosa E. Gavilán²,
Alberto Cepeda², Krzysztof Kwiatek¹

¹ Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Polska

² Zakład Chemii Analitycznej, Żywienia i Bromatologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Santiago de Compostela, Lugo, Hiszpania

Od momentu odkrycia antybiotyków w latach 40-tych XX w. stały się one nieodzowną częścią lecznictwa weterynaryjnego. Przez szereg lat stosowane były jako tzw. antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW) wpływające na tempo przyrostów masy ciała zwierząt rzeźnych. Niestety już w 1969 roku w opublikowanym raporcie Swanna opisano, że jedną z głównych przyczyn rosnącej lekooporności drobnoustrojów chorobotwórczych jest nieracjonalne i nadmierne stosowanie substancji przeciwbakteryjnych w lecznictwie weterynaryjnym, głównie jako ASW w paszach. Od lat 70-tych XX w. zaczęto wycofywać ASW ze stosowania u zwierząt rzeźnych, aż w 2006 roku zakazano w krajach należących do Unii Europejskiej całkowitego ich stosowania w paszach. Obecnie jedyną legalną formą podawania substancji przeciwbakteryjnych w paszach są pasze lecznicze wytwarzane w zarejestrowanych i posiadających zezwolenie na ich produkcję wytwórniach.

Aktualnie w krajach członkowskich UE prowadzona jest kontrola pasz zarówno leczniczych (na zgodność z deklaracją producenta lub homogeniczność) oraz pasz niedocelowych (mieszanek czyszczących czy pasz pochodzących z gospodarstw). W przypadku pasz niedocelowych obecnie obowiązuje termin „zero tolerancji”, co oznacza, że w paszy „nie leczniczej” nie mogą występować nawet śladowe ilości substancji przeciwbakteryjnych.

W przypadku pasz, aktualnie nie ma wyznaczonych żadnych limitów pozostałości, czy maksymalnych limitów pozostałości oraz oficjalnych metod analitycznych, co daje dowolność w kreowaniu metod umożliwiających wykrywanie i oznaczanie substancji przeciwbakteryjnych w paszach niedocelowych. Przez wiele lat do skriningu stosowane były metody mikrobiologiczne, lecz metody te wykazują niewystarczającą selektywność i specyficzność dla niskich stężeń substancji przeciwbakteryjnych w paszach. Metody te zaczęto zastępować technikami chromatograficznymi z detekcją: UV, DAD, FLD czy spektrometrii mas (MS lub MS/MS). Obecnie jedną z najczulszych, najbardziej selektywnych i specyficznych jest technika LC-MS/MS.

Celem prezentowanej pracy było opracowanie metody wieloskładnikowej pozwalającej na analizę kilkunastu substancji przeciwbakteryjnych z różnych grup chemicznych w paszach niedocelowych w jednym postępowaniu analitycznym techniką LC-MS/MS.

Do badań wybrano następujące związki: ciprofloksacyne, enrofloksacyne, erytromycyne, linkomycyne, penicylinę G, tiamulinę, trimetoprim, tylozynę, sulfadiazynę, sulfametazyne i walnemulinę. Z dwugramowej próbki paszy przeprowadzono ekstrakcję wymienionych związków z zastosowaniem mieszaniny 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Tak przygotowane próbki wytrząsano, a następnie odwirowano i 4 ml otrzymanego ekstraktu zatężono w strumieniu azotu. Pozostałość rozpuszczono w wodzie o pierwszej klasie czystości i oczyszczono przez filtr strzykawkowy. Przygotowaną próbkę poddano analizie chromatograficznej z zastosowaniem układu LC-ESI-MS/MS. Rozdział analizowanych związków przeprowadzono na kolumnie bifenylowej z zastosowaniem fazy ruchomej składającej się z 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu i 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie Mili-Q. Czas analizy wynosił 24 minuty.

Opracowaną metodę poddano walidacji zgodnie z wytycznymi zawartymi w Decyzji Komisji Europejskiej 657/2002/EC. Otrzymano zadawalające parametry walidacyjne z wysokimi odzyskami w granicach od 76,04 do 117,39% oraz współczynnikami zmienności mieszczącymi się w zakresie 2,41 do 19,27%. Opracowana metoda pozwala na oznaczanie jedenastu związków przeciwbakteryjnych w próbce paszy w zakresie od 250 do 2500 µg/kg oraz wykazuje przydatność do rutynowych analiz próbek pasz różnego pochodzenia.

Mykotoksyny i ich metabolity w paszach dla zwierząt – nowe wyzwania w toksykologii weterynaryjnej*

Ł. Panasiuk¹, P. Jedziniak

*Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu
Badawczego w Puławach, Polska*

Mykotoksyny są to wtórne metabolity grzybów pleśniowych, powszechnie obecne m.in. w zbożach, a także w paszach. Stanowią istotny problem w toksykologii weterynaryjnej, wykazując właściwości teratogenne, neurotoksyczne, kancerogenne, teratogenne bądź estrogenne. Z toksykologicznego punktu widzenia najważniejszymi mykotoksynami są: aflatoksyna B1, deoksynivalenol (DON), zearalenon (ZEN), ochratoksyna, fumonizyny B1 i B2 (FB1 i FB2) oraz toksyna T-2 i HT-2, które posiadają sugerowane dopuszczalne limity w paszach oraz aflatoksyna M1, cytrynina i patulina w żywności.

Ostatnio dużo uwagi poświęca się także metabolitom mykotoksyn, powstającym w wyniku biotransformacji przeprowadzonej przez grzyby, bakterie, bądź rośliny. Te modyfikowane mykotoksyny są szczególnie istotne, gdyż mogą mieć zdecydowanie wyższą toksyczność niż forma podstawowa (np. ZEN metabolizowany do α -zearalenolu), bądź w wyniku trawienia w przewodzie pokarmowym mogą być uwalniane do bardziej toksycznej formy podstawowej przez odłączenie reszty cukrowej (np. deoksyniwalenol-3-glikozyd; DON-3G), co skutkuje niedoszacowanymi wynikami monitorowanych pasz. Z drugiej strony naukowcy coraz częściej zwracają uwagę na występowanie

* Badania finansowane z projektu KNOW Konsorcjum „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, MNiSW nr 05-1/KNOW2/2015.

¹ e-mail: lukasz.panasiuk@piwet.pulawy.pl

tw. „emerging mycotoxins” w żywności dla ludzi i zwierząt. Ciągłe niewiele jest informacji na temat ich toksyczności, a także ich ewentualnemu przechodzeniu do produktów pochodzenia zwierzęcego. Dlatego też, Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności opublikował raport, w którym podkreśla konieczność ciągłego monitorowania poziomów „emerging mycotoxins” (np. enniatyny; ENNs, bowerycyna; BEA) w paszach oraz żywności, a także wskazuje potrzebę kolejnych badań toksykologicznych, gdyż obecna wiedza nie pozwala na ustalenie tolerowanego dziennego spożycia (TDI) poszczególnych toksyn, prawidłowej oceny ryzyka, a w konsekwencji ustalenia urzędowego limitu.

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione aspekty, rozpoczęto badania nad opracowaniem metod analitycznych oznaczania mykotoksyn w paszach przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), które umożliwiają jednoczesne oznaczanie kilkudziesięciu toksyn i ich pochodnych. Opracowane metody analityczne zostały wykorzystane do wstępnego zbadania próbek zarówno mieszanek paszowych jak i kiszzonek dla bydła.

Wyniki przebadanych 80 próbek pasz wskazują, że występowanie mykotoksyn regulowanych jest na stałym poziomie, aczkolwiek zdecydowanie poniżej ustalonych limitów. Spośród wszystkich analitów najczęściej oznaczane były DON, ZEN, FB2, T-2 oraz niwalenol, obecne w ponad 60% przebadanych próbek. W przypadku analiz mykotoksyn modyfikowanych na uwagę zasługują stężenia DON-3G, które stanowiły około 25% macierzystego analitu. Co więcej, bardzo często wykrywane były „emerging mycotoxins”, np. BEA, która była obecna w 90% przebadanych kiszzonek dla bydła. Analiza statystyczna pokazała także silną korelację pomiędzy stężeniami niektórych mykotoksyn np. DON i ZEN (0,74, $p < 0,05$). Przedstawione wyniki badań pokazują, że istnieje duże ryzyko narażenia zwierząt na mykotoksyny, dlatego potrzebny jest ciągły monitoring pasz.

Indukcja pluripotencji makrofagów świń w kontekście uzyskania linii komórkowych do namnażania wirusa ASF

K. Urbaniak^{1,2,3}, J.A. Richt²

¹ Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Polska

² Wydział Medycyny Diagnostycznej/Patobiologii, Uniwersytet Stanowy Kansas w Manhattan, KS, USA; Centrum Doskonalenia nad pojawiającymi się i zoonotycznymi chorobami zwierząt (CEEZAD), Uniwersytet Stanowy Kansas w Manhattan, KS, USA

Afrykański pomór świń (ASF) jest wysoce zakaźną i najczęściej śmiertelną chorobą trzody chlewnej i dzików. Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest duży, otoczkowy wirus będący jedynym przedstawicielem rodziny *Asfarviridae*. Wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV) zakaża głównie komórki odpornościowe linii mieloidalnej, przede wszystkim monocyty i makrofagi [1]. W związku z tym monocyty i/lub makrofagi pobrane od zdrowej świni wykorzystywane są do izolacji ASFV i diagnostyki ASF. Obecnie jest to jedyny znany system *in vitro* umożliwiający namnażania wszystkich szczepów ASFV. Praca z hodowlą pierwotną obciążona jest jednak pewnymi wadami, tj. na przykład konieczność ciągłego dostępu do źródła komórek, żmudny i kosztowny proces ich pozyskiwania, a także zmienność między uzyskanymi seriami komórek [2]. Najlepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie linii komórkowej wrażliwej na zakażenie ASFV. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć informacje o kilku liniach (np. VERO, COS-1, 3D4/2, WSL), które umożliwiają namnażanie niektórych, przeważnie uprzednio zaadoptowanych do nich szczepów ASFV.

W związku z tym istnieje potrzeba uzyskania linii komórkowej, najlepiej pochodzącej z komórek naturalnego gospodarza, wrażliwej na zakażenie wszystkimi szczepami ASFV. Tak więc celem tej pracy była próba pozyskania indukowanych, pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC)

z makrofagów świni. Pluripotencjalne komórki macierzyste mają zdolność samoodnowy i mogą być utrzymywane w hodowli *in vitro* w nieskończoność.

W doświadczeniu użyto makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego oraz makrofagi alweolarne pobrane od świni wolnej od zakażenia ASFV. Następnie komórki te poddano reprogramowaniu poprzez wprowadzenie genów kodujących białka KLF4, SOX2, OCT4, c-MYC, NANOG oraz LIN28A. W tym celu posłużono się wektorami lentiwirusowymi drugiej generacji (psPAX2, pMD2.G, pSIN4-CMV-K2M, pSIN4-EF2-O2S pSIN4-EF2-N2L) firmy Addgene.

Szczepki bakteryjne z w/w plazmidami namnożono zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie plazmidy oczyszczono przy użyciu zestawu firmy Qiagen. Wykonano transfekcję komórek linii A293T ostatecznie uzyskując trzy lentiwirusy zawierające po dwa geny: KLF4 i c-MYC, OCT4 i SOX2 lub NANOG i LIN28A, dla których następnie określono liczbę kopii przy użyciu ilościowego PCR w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją. Znając liczbę kopii wykonano ko-infekcję makrofagów świń trzema lentiwirusami w równych proporcjach [3]. Po 4 dniach od transdukcji, zakażone makrofagi przeniesiono na 6-dołkowe płytki zawierające inaktywowane mysie embrionalne fibroblasty (iMEF), służące jako warstwa odżywcza dla hodowli iPSC. Codziennie zmieniano medium: DMEM/F12 z substytutem surowicy, β -merkaptetanolem, aminokwasami endogennymi, penicyliną/streptomycyną oraz zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów. Po 15-20 dniach potencjalne kolonie iPSC (przyżyciowe barwienie znakowanymi przeciwciałami Tra-1-60 i Tra-1-81) pasażowano i prowadzono hodowlę w medium iPSC firmy Stemcell (TeSR-E8) i bez iMEF, codziennie zmieniając medium. Następnie wyrośnięte, potencjalne kolonie iPSC zawieszono w specjalnym medium firmy Stemcell (mFreSR), zamrożono i przechowano w ciekłym azocie do dalszych badań.

Piśmiennictwo:

- Franzoni G. et al., *Vet Microbiol.* 2017, 198, 88-98.
Sanchez E.G. et al., *Scientific Reports* 2017, 7:10369.
Nethercott et al., *Methods Mol Biol.* 2011, 767, 67-85.

SESJA
PLENARNA III

Immunoterapia komórkowa w leczeniu nowotworów u psów*

J. Bujak¹, I. Szopa¹, A. Łabędź¹, K. Majchrzak^{1, 2}

¹ Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Polska

Immunoterapia komórkowa stanowi obecnie jedną z najbardziej obiecujących metod leczenia nowotworów, również tych w zaawansowanym stadium rozwoju. Spośród różnych rodzajów immunoterapii, najbardziej skuteczny jest adoptywny transfer komórek (ang. Adoptive Cell Transfer – ACT), który polega na podaniu do krwioobiegu pacjenta onkologicznego miliardów żywych efektorowych komórek immunologicznych, głównie limfocytów T cytotoksycznych lub komórek NK. Źródłem komórek służących do transferu może być tkanka nowotworowa lub krew obwodowa pacjenta onkologicznego. W pierwszym przypadku izolowane i namnażane są tzw. limfocyty infiltrujące nowotwór, w drugim wyizolowane z krwi komórki są modyfikowane genetycznie, aby specyficznie rozpoznawały antygeny nowotworowe. Dzięki takiej modyfikacji limfocyty T wykazują ekspresję chimerycznego receptora antygenowego (ang. Chimeric Antigen Receptor – CAR), który pozwala im rozpoznawać i niszczyć komórki rakowe.

Rozwój metod związanych z immunoterapią u ludzi wymaga jednak przeprowadzenia badań przedklinicznych i klinicznych z wykorzystaniem organizmów immunokompetentnych. Stosownym do tego modelem badawczym

* Projekt „Modification of signaling pathways in canine Th17 lymphocytes subset to improve adoptive cellular immunotherapy for humans” realizowany w ramach programu FIRST TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej; ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014 – 2020.

Badania pilotażowe finansowane w ramach projektu badawczego ESR (Early Stage Researcher) oraz stypendium POST-DOC Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę-Bezpieczna Żywność” KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący).

² e-mail: kinga_majchrzak@sggw.pl

jest pies domowy (*Canis lupus familiaris*), będący pacjentem klinik weterynaryjnych. W przeciwieństwie do modelu myszy laboratoryjnej, guzy nowotworowe u psów powstają naturalnie i spontanicznie oraz charakteryzują się dużą różnorodnością, podobnie jak u ludzi. Istnieje wiele podobieństw genetycznych, epidemiologicznych i klinicznych między nowotworami u ludzi i psów. Na poziomie komórkowym procesy zachodzące podczas rozwoju choroby nowotworowej są niemal identyczne u obu gatunków. Podobnie, funkcjonowanie układu odpornościowego i odpowiedź immunologiczna wykazują wiele cech wspólnych.

Badania przez nas prowadzone skupiają się na limfocytach T pomocniczych typu 17 (Th17) w celu poprawy protokołów immunoterapii u ludzi*. Limfocyty Th17 stanowią stosunkowo niedawno odkrytą subpopulację komórek zaangażowanych w procesy autoimmunologiczne. Badania wykazały również ich niezwykle potężny potencjał w zwalczaniu złośliwego nowotworu skóry, czerniaka, w immunoterapii u myszy. Komórki te charakteryzują się dużą plastycznością i zdolnością do samoodnowy. Celem projektu jest poprawa aktywności przeciwnowotworowej psich limfocytów Th17 poprzez modyfikacje szlaków sygnałowych (PI3K i Wnt/ β - kateniny). Aktywacja limfocytów jest złożonym procesem polegającym na zaangażowaniu zarówno receptora limfocytów T jak i receptorów kostymulujących oraz interleukiny 2. Przeprowadzone przez nas badania wskazują także na wpływ temperatury, pH oraz siły sygnału stymulującego na aktywację limfocytów izolowanych od psów.

Badania na modelu psa domowego są niezwykle ważne dla onkologii porównawczej i rozwoju immunoterapii człowieka, mają także duże znaczenie w poszerzeniu zakresu terapii oferowanych w onkologii weterynaryjnej.

SESJA III

**Innowacyjne metody diagnostyki,
profilaktyki i terapii chorób zwierząt i ludzi**

Przeciwpalna funkcja receptorów TRPA1 i TRPV1 w przebiegu eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka

M. Załęcki¹, J. Kun², J. Kaleczyc¹, Z. Helyes², E. Pintér²

¹ Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

² Katedra Farmakologii i Farmakoterapii, Wydział Medyczny, Uniwersytet w Pécs, Węgry

Rodzina receptorów przejściowego potencjału TRP (ang. transient receptor potential), której głównymi przedstawicielami jest receptor ankirynowy (TRPA1), oraz waniloidowy (TRPV1) odgrywa ważną rolę w odpowiedzi tkanek na bodźce ze środowiska zewnętrznego. Receptory pobudzane są szeregiem bodźców fizycznych (takich jak zmiany temperatury) oraz chemicznych (kapsaicyna, akroleina – substancje powszechnie występujące w ostrych przyprawach). Większość współcześnie prowadzonych badań wiąże funkcję receptorów TRPA1 i TRPV1 z wyzwaniem nerwowych impulsów czuciowych, choć zmiany ekspresji tych receptorów były obserwowane także w przebiegu stanów zapalnych występujących na terenie układu oddechowego, a w świetle najnowszych badań, także układu pokarmowego. Stany zapalne przewodu pokarmowego należą do grupy schorzeń zwierząt gospodarskich bezpośrednio wpływających na produkcję zwierzęcą (np. trzody chlewnej). Na przestrzeni lat zmieniał się również pogląd na temat spożywania ostrych przypraw przez ludzi cierpiących na owrzodzenia żołądka – pierwotnie uważano, że ich spożywanie jest wysoce niewskazane, podczas gdy eksperymenty ostatnich lat sugerują ich korzystny wpływ. Wobec powyższego, przeprowadziliśmy eksperyment mający na celu weryfikację udziału receptora TRPA1 oraz TRPV1 w przebiegu eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka wykorzystując odpowiednie myszy knock-out.

W eksperymencie wykorzystano 3 grupy myszy knock-out (TRPA1 KO, TRPV1 KO, TRPA1-V1 – podwójny KO) oraz grupę myszy kontrolnych (wild animals – C57). Zwierzęta w każdej z grup były podzielone na 2 podgrupy, z których jedna otrzymywała 200 µl 50% EtOH zgłębnikiem bezpośrednio do żołądka przez 2 kolejne dni (podgrupa alkoholowa), natomiast druga w ten sam sposób otrzymywała roztwór soli fizjologicznej (podgrupa bezalkoholowa).

W fazie końcowej eksperymentu zwierzęta poddano eutanazji i wypreparowano żołądki. Stopień zaawansowania stanu zapalnego błony śluzowej żołądka był oceniany makroskopowo, natomiast wykorzystując technikę Real-Time PCR określano zmiany poziomów ekspresji genu kodującego interleukinę 6 (IL6) w żołądku.

Badanie makroskopowe wykazało bardzo zaawansowane zmiany zapalne obejmujące duży obszar błony śluzowej żołądka u wszystkich zwierząt nokautowych poddanych działaniu alkoholu (podgrupy alkoholowe), natomiast u wszystkich zwierząt z grup bezalkoholowych, jak również u zwierząt kontrolnych (C57) z podgrupy alkoholowej błona śluzowa nie wykazywała zmian patologicznych, lub obserwowane zmiany były ledwie dostrzegalne.

Analiza wyników Real-Time PCR wykazała 5.2-krotny wzrost ekspresji genu kodującego IL-6 w alkoholowej podgrupie zwierząt kontrolnych C57 (w stosunku do zwierząt bezalkoholowych) natomiast w grupach zwierząt knock-out wzrosty te wynosiły odpowiednio: 27.8, 40.3 i 102.6 dla TRPV1 KO, TRPA1 KO oraz TRPA1-V1 podwójnego KO.

Uzyskane wyniki bezsprzecznie wykazują istotną funkcję ochronną i przeciwpalną pełnioną przez receptory TRPA1 i TRPV1 w przebiegu stanu zapalnego błony śluzowej żołądka jak również uwidaczniają ich synergistyczne współdziałanie.

Wpływ TGF β 1, TGF β 3 oraz naskórkowych mediów pochodowlanych na cechy funkcjonalne fibroblastów skóry właściwej pochodzących od myszy Balb/c (Foxn1^{+/+}; model gojenia bliznowego) oraz myszy nude (Foxn1^{-/-}; model gojenia regeneracyjnego)*

Joanna Bukowska, Marta Kopcewicz, Anna Kur-Piotrowska, Anna Zuzanna Szostek-Mioduchowska, Katarzyna Walendzik, Barbara Gawronska-Kozak

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Polska

Gojenie ran skórnych u ssaków odbywa się na drodze reperacji, która w przeciwieństwie do sporadycznie występującej, bezbliznowej regeneracji, związana jest z rozwojem fibrozy i wytworzeniem blizny. Kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za gojenie ran w sposób bliznowy jest czynnik transkrypcyjny Foxn1. Jakkolwiek ekspresja Foxn1 ogranicza się do komórek naskórka (keratynocytów), jego działanie rozprzestrzenia się na całą skórę, stanowiąc jeden z kluczowych elementów determinujących dialog pomiędzy poszczególnymi warstwami tej tkanki.

Celem badań była analiza porównawcza cech funkcjonalnych fibroblastów skóry właściwej (DFs) pochodzących od myszy Balb/c (Foxn1^{+/+}) reprezentujących sposób gojenia bliznowego oraz myszy nude (Foxn1^{-/-})

* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący) Konsorcjum Naukowe „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego No 05-1/KNOW2/2015, numer grantu UMO-KNOW2016/IRZiBŻ/ESR2/01/2 oraz współfinansowane ze środków Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, grant wewnętrzny GW11/2014.

stanowiących unikatowy model gojenia bezbliznowego (regeneracja). Szczególną uwagę zwrócono na różnice we wrażliwości obu typów DFs na działanie kluczowych dla procesu gojenia cytokin: TGF β 1 oraz TGF β 3. Zbadano także wpływ naskórkowych mediów pohodowlanych (keratinocyte conditional media – KCM) pochodzących z hodowli keratynocytów izolowanych od myszy Balb/c oraz nude na wybrane cechy komórkowe DFs.

Wykazano wyższy potencjał proliferacyjny DFs nude w porównaniu do DFs Balb/c ($p < 0,05$), jak również zaobserwowano większe zdolności DFs nude do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych ($p < 0,0001$). Fibroblasty izolowane od myszy Foxn1 $^{+/+}$ (Balb/c) charakteryzowały się szybszym tempem migracji ($p < 0,05$) oraz zwiększoną zdolnością obkurczania dysków kolagenowych ($p < 0,05$) w porównaniu do DFs pochodzących od myszy Foxn1 $^{-/-}$ (nude). Wykazano stymulujący wpływ TGF β 1 (izoforma pro-fibrotyczna) oraz TGF β 3 (izoforma anty-fibrotyczna) na żywotność DFs Balb/c, jednakże nie obserwowano wpływu tych cytokin na żywotność DFs nude. Obydwie izoformy hamowały zdolności migracyjne DFs izolowanych zarówno od myszy Balb/c jak i myszy nude ($p < 0,01$). Natomiast wyłącznie TGF β 3 zwiększał poziom aktywności mięśni gładkich (α SMA; markera fibrozy) oraz syntezę kolagenu typu 1 w DFs nude. Wpływ KCM na żywotność DFs różnił się w zależności od typu medium wykazując przeciwstawne działanie dla KCM pochodzących z hodowli keratynocytów Foxn1 $^{+/+}$ oraz keratynocytów Foxn1 $^{-/-}$.

Cechy funkcjonalne DFs, istotne z punktu widzenia gojenia ran, różnią się w zależności od typu skóry (typ regeneracyjny skóry (nude; Foxn1 $^{-/-}$) vs typ naprawczy skóry (Balb/c; Foxn1 $^{+/+}$)). Podobnie, wrażliwość DFs na działanie cytokin (TGF β 1, TGF β 3) oraz KCM wykazuje istotne różnice pomiędzy badanymi modelami myszy prowadząc do konkluzji, iż działanie czynnika Foxn1 wykracza poza miejsce jego ekspresji (naskórek) kształtując cechy komórek warstwy dermalnej, która aktywnie uczestniczy w procesie gojenia ran.

Wpływ transformującego czynnika wzrostu- β 1 na metaloproteinazy w procesie włóknienia macicy kłaczy

A.Z. Szóstek-Mioduchowska¹, A. Baćławska¹, K. Okuda^{2,3}, D.J. Skarzynski¹

¹ Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

² Laboratory of Reproductive Endocrinology Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, Japan

³ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan

Endometrosis to wieloczynnikowe schorzenie, będące jedną z głównych przyczyn wczesnego obumierania zarodków, zmniejszonej płodności oraz poronień u kłaczy. Cechą charakterystyczną tego schorzenia jest włóknienie zrębu łącznotkankowego oraz tworzenie torebek włóknistych okołonacyniowych i okołogruzołowych. Proces włóknienia jest konsekwencją nadmiernego odkładania kolagenu oraz innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Jedną z kluczowych cytokin biorących udział w procesie włóknienia jest transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF)- β 1. U kłaczy wykazano, że poziom TGF- β 1 rośnie w błonie śluzowej macicy w przebiegu *endometrosis*. Głównym zadaniem metaloproteinaz (MMP) jest rozkład składników ECM, a zachwianie równowagi pomiędzy produkcją składników ECM, a aktywnością enzymów ją rozkładających być może przyczynia się do procesu włóknienia tkanek. Głównym celem prowadzonych badań jest opisanie roli TGF- β 1 w kontekście regulacji ekspresji i aktywności metaloproteinaz i ich inhibitorów w procesie włóknienia błony śluzowej macicy kłaczy.

W celu określenia wpływu TGF- β 1 na ekspresję i uwalnianie metaloproteinaz (MMP-1, 2, 3, 9 i -13) oraz TIMP-1 i -2 wykonano hodowle komórkowe fibroblastów pochodzących z błony śluzowej macicy kłaczy. Komórki stymulowano TGF- β 1 w dawkach: 1; 5; 10 ng/ml przez 24, 48 i 72 godz. Następnie w medium hodowlanym określono stężenie MMP-1, 2, 3, 9 i -13

oraz TIMP-1 i -2 przy użyciu metody immunoenzymatycznej (EIA), ekspresję tych czynników na poziomie mRNA przy użyciu Real-time PCR oraz aktywność MMP-2 i MMP-9 przy użyciu zymografii. Uzyskane wyniki wskazują, że TGF- β 1 we wszystkich dawkach nie miał wpływu na uwalnianie i ekspresję MMP-2 na poziomie mRNA ($P > 0.05$) oraz aktywność pro-MMP-2 ($P > 0.05$) po 24, 48 i 72 godz. Z kolei TGF- β 1 w zależności od zastosowanej dawki i czasu stymulacji zwiększał aktywność pro-MMP-9, ekspresję oraz uwalnianie MMP-9 z fibroblastów błony śluzowej macicy kłaczy ($P < 0.05$). Stwierdzono również, iż TGF- β 1 w zależności od zastosowanej dawki i czasu stymulacji wpływał na ekspresję i uwalnianie MMP-1, -3, -9, -13 oraz TIMP-1 ($P < 0.05$)

Otrzymane wyniki sugerują, że TGF- β 1 nie blokuje aktywności metaloproteinaz poprzez wpływ na ekspresję i uwalnianie TIMP-2. Uzyskane wyniki wskazują, że TGF- β 1 bierze udział w przebudowie błony śluzowej macicy kłaczy poprzez wpływ na ekspresję MMP-1, -3, -9, -13 oraz TIMP-1, ale nie poprzez wpływ na ekspresję, uwalnianie i aktywność MMP-2.

The role of p38MAPK/MiTF axis in hematopoietic stem cells depletion in Fanconi anemia cells*

A. Oppezzo^{1,2,3}, K. Urbańska^{2,4,5}, J. Bourseguin^{1,2,3}, E. Renaud^{1,2,3},
F. Rosselli^{1,2,3}, P. Pawlikowska^{1,2,3}

¹ CNRS – UMR8200, Équipe labellisée „La Ligue contre le Cancer”, Villejuif, France

² Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France

³ Université Paris Saclay – Paris Sud – Orsay, France

⁴ Warsaw University of Life Sciences – SGGW-WULS, Warsaw, Poland

Fanconi anemia (FA) is an inherited disease caused by loss-of function mutations in one of the 21 *FANC* genes (*FANC A-U*). It is characterized by physical abnormalities, genomic instability and predisposition to malignancies. Moreover, Fanconi anemia is almost always characterized by an exhaustion of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) which leads to progressive bone marrow failure (BMF). One of the most frequently affected genes in FA patient is *FANCA*. Thus, it indicates a significant role of *FANCA* protein in bone marrow physiology.

The molecular pathogenesis of BMF during FA still remains unknown. However, some data indicate that p38MAPK signaling pathway is chronically active in FA cells. Moreover, it acts upstream to the transcription factor Microphthalmia (MiTF) – recently described as a transcriptional regulator of the expression of several *FANC* genes.

Thus, the aim of this study was to verify if alterations in the p38MAPK/MiTF axis are present in the mouse model of FA and if so, define their role in

* Staż finansowany przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, nr umowy: UMO-KNOW2016/SGGW/PDC3/01/1.

⁵ e-mail: kaja_urbanska@sggw.pl

the BMF development in FA. The researches were conducted on mouse model knock out in *Fanca*, *FANCA* mutated human lymphoblasts derived from FA patients as well as HeLa cells transfected with siRNA against *FANCA*.

The results have shown that unstressed *Fanca*^{-/-} mice present several hallmarks of stress hematopoiesis, including constitutive activation of the p38MAPK signaling pathway. Moreover, *FANCA*-loss-of function in hematopoietic mouse cells or in human cells from FA patients leads to a stable expression of MiTF in p38MAPK-dependent manner. The high expression of MiTF results in increased cycling of normally quiescent HSPCs and appears to constitute the direct reason of their premature exhaustion. Finally, it was discovered that the shRNA-mediated depletion of *Mitf* or the reduction of its expression following p38MAPK inhibition lead to a significant improvement of FA hematopoiesis and to an efficient prevention of their genomic instability.

The overall results elucidate a mechanism that participates in BMF development in FA patients. They indicate that HSC dormancy and function can be restored by p38MAPK/MiTF signaling inhibition. Thus, an inhibition of p38MAPK could be included in FA treatment modality in the future.

Komórkowe metody diagnozowania przerzutów nowotworowych w płucach myszy BALB/c metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET)*

Ł. Kiraga^{1,2}, Ł. Cheda³, K. Kilian³, Z. Rogulski³, A. Boffi⁴,
S. Paisey⁵, M. Król¹

¹ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa, Polska

³ Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, Polska

⁴ Uniwersytet Sapienza, Rzym, Włochy

⁵ Uniwersytet Walijski, Cardiff, Wielka Brytania

Według statystyk – nowotwory, po chorobach układu sercowo-naczyniowego, są drugą przyczyną zgonów na świecie. Większość zgonów z powodu choroby nowotworowej związana jest z obecnością przerzutów. Wykrycie nawet małego przerzutu, z reguły nie oznacza wykrycia choroby we wczesnym stadium. Rokowanie w chorobie nowotworowej jest tym lepsze, im wcześniej dojdzie do postawienia diagnozy i rozpoczęcia leczenia. Dlatego też niezwykle ważne są badania nad poprawą technik diagnostycznych do wykrywania najmniejszych przerzutów nowotworowych – mikroprzerzutów.

Badania przeprowadzono za pomocą techniki obrazowania funkcjonalnego – pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Mysiom BALB/c z rakiem jelita grubego CT26 (model nieprzerzutuujący) lub rakiem sutka 4T1 (model przerzutuujący) wstrzyknięto makrofagi linii RAW 264.7 wyznakowane odpowiednim

* Badania finansowane z Grantu nr UMO-2015/18/E/NZ6/00642 SONATA BIS przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

² e-mail: lukkir@outlook.com

radioznacznikiem. Radioznacznikami znakowano komórki bezpośrednio, albo najpierw łączono je z cząsteczkami apoferrytyny i powstały kompleks łądowano do komórek. Do niniejszych badań wykorzystywano makrofagi aktywowane interleukiną-4, co zmieniło ich stopień polaryzacji z M0 na M2. Makrofagi spolaryzowane w kierunku M2 (aktywacja alternatywna) cechują się tym, że mają preferencje do naciekania miejsc hipoksyjnych. Po dotarciu do silnie hipoksyjnego guza nowotworowego lub ogniska przerzutowego, makrofagi zatrzymywały się w tych miejscach i emitowały promieniowanie, obserwowane przez detektory PET. Po rekonstrukcji obrazów, poddano je analizie jakościowej (renderowanie graficzne) i ilościowej w programie PMOD. Na koniec myszy poddawano eutanazji, pobrano narządy i wysyłano do badania histopatologicznego na obecność ognisk nowotworowych.

Uzyskane obrazy PET oraz analiza statystyczna z zebranych danych liczbowych wskazują, że podane dożylnie makrofagi w pierwszym etapie dostają się do płuc, które zaczynają stopniowo opuszczać i przedostawać się do guza pierwotnego. W przypadku obecności przerzutów nowotworowych komórki nie tylko opuszczają płuca znacznie wolniej niż w przypadku zdrowych płuc, ale też pozostają w miejscach obecności przerzutów nowotworowych pozwalając na ich lokalizację.

Niniejsze wyniki, poparte badaniami histopatologicznymi, stanowią dowód słuszności założenia, że wyznakowane radioaktywnie makrofagi M2 naciekają miejsca hipoksyjne i dzięki temu mogą być „narzędziem diagnostycznym” do wykrywania małych przerzutów w płucach.

Wpływ neostygminy na ekspresję genów interleukiny -1 β i jej receptorów w wybranych strukturach mózgu owcy czasie ogólnoustrojowego stanu zapalnego*

M. Tomczyk^{1,3}, J. Bochenek¹, D. Tomaszewska-Zaremba², A.P. Herman¹

¹ Zakład Inżynierii Genetycznej

² Zakład Fizjologii Zwierząt

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN, Polska

Chorobom neurodegeneracyjnym centralnego układu nerwowego towarzyszą zmiany neurologiczne pojawiające się w predylekcyjnych obszarach mózgu. Zmiany te prowadzą do wystąpienia szeregu uszkodzeń, które w następstwie mogą powodować zaburzenia związane z pamięcią, funkcją poznawczą czy motoryczną. Równolegle w obszarach tych stwierdza się stan zapalny. Uważa się, że stan zapalny może powstawać w wyniku strukturalnych aberracji i uszkodzeń tych obszarów mózgu towarzyszących chorobom neurodegeneracyjnym. Jednakże najnowsze badania sugerują, że lokalny stan zapalny może także przyczyniać się do powstawania patologicznych zmian w tych rejonach mózgu i depozycji w nich białek charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych. Jedną z przyczyn promujących powstawanie zmian zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) mogą być infekcje zarówno bakteryjne jak i wirusowe. Stwierdzono, że towarzyszący im obwodowy stan zapalny stymuluje syntezę cytokin zapalnych m.in. interleukiny

* Badania finansowane z Grantu „Grant na start” przyznanego przez Dyrektora Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN.

³ e-mail: m.tomczyk@ifzz.pl

(IL)-1 β w OUN, która jest uważana za jeden z czynników stymulujących zmiany neurodegeneracyjne. Dlatego obniżenie jej poziomu w OUN jest istotnym elementem leczenia tych chorób.

Celem niniejszych badań było określenie wpływu obwodowego podania inhibitora acetylocholinoesterazy (AChE) – neostygminy, niezdolnego do przekraczania bariery krew-mózg, na ekspresję genów kodujących IL-1 β i jej receptory w wybranych strukturach mózgu owcy w czasie ogólnoustrojowego stanu zapalnego wywołanego podaniem endotoksyny bakteryjnej – lipopolisacharydu (LPS).

Doświadczenie przeprowadzono na 24 owcach rasy czarnogłówka, które przydzielono do jednej z czterech grup doświadczalnych (po 6 osobników w każdej): I kontrolną (sól fizjologiczna, iv.), II traktowaną neostygminą (0,5 mg/zwierzę, iv.), III traktowaną LPS – (400 ng/kg, iv.), IV traktowaną zarówno neostygminą jak i LPS. Owcom pobrano krew 3 godz. po podaniu LPS lub soli fizjologicznej, po czym zwierzęta niezwłocznie poddano eutanazji. Od zwierząt pobrano fragmenty hipokampa, kory czołowej oraz mózdzku. Poziom IL-1 β we krwi oznaczono metodą ELISA. Technika Real-Time PCR oznaczono poziom względnej ekspresji genów kodujących IL-1 β oraz jej receptory (IL-1R) typu 1 i 2.

Stwierdzono, że iniekcja neostygminy zniósła stymulujący wpływ LPS na uwalnianie IL-1 β do krwi i zahamowała transkrypcję genu kodującego prozapalną IL-1 β w hipokampie, korze czołowej oraz mózdzku. Podanie neostygminy obniżyło również indukowany podaniem endotoksyny poziom ekspresji mRNA dla IL-1R1 i IL-1R2 w hipokampie, ale nie wpłynęło na stymulowaną LPS ekspresję genów kodujących IL1R1 i IL1R2 w korze czołowej i mózdzku.

Przeprowadzone badania wskazują, że obniżenie poziomu cytokin zapalnych we krwi w czasie ogólnoustrojowego zapalenia może wystarczyć do zahamowania transmisji sygnału zapalnego do parenchymy mózgu. Sugeruje to, że inhibitory AChE nieprzekraczające bariery krew-mózg mogą skutecznie przeciwdziałać zmianom zapalnym w OUN, które towarzyszą infekcjom bakteryjnym lub wirusowym.

Wpływ chlorofiliny na wchłanianie deoksyniwalenolu – badania *ex vivo**

M. Mendel^{1,2}, W. Karlik¹

¹ Zakład Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Polska

Zanieczyszczenie pasz mikotoksynami budzi od lat wielkie zainteresowanie i niepokój ze względu na ich negatywny wpływ na zdrowie zwierząt. Ponadto narażenie zwierząt produkcyjnych na toksyny grzybicze może zagrażać bezpieczeństwu żywności pochodzenia zwierzęcego i w efekcie stanowić ryzyko dla zdrowia człowieka. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach dowodzą, że 30 do nawet 100% próbek produktów spożywczych i pasz zanieczyszczonych jest jedną lub kilkoma mikotoksynami. Deoksyniwalenol (DON) jest toksyną z grupy trichotecenów, która wymieniana jest wśród mikotoksyn najczęściej zanieczyszczających pasze, jak również stanowiącą największe zagrożenie dla zdrowia i produktywności świń w Europie. Jedną z metod wykorzystywanych do ograniczenia narażenia świń na mikotoksyny jest stosowanie adsorbentów jako dodatków paszowych. Niestety standardowo stosowane adsorbenty nie są wystarczająco skuteczne w ograniczaniu narażenia zwierząt na DON. Obiecującym kandydatem na środek sorpcyjny, który mógłby skutecznie redukować wchłanianie DON z przewodu pokarmowego narażonych świń jest chlorofilina (CHL), czyli kompleks chlorofilu z miedzą. W przeszłości udowodniono hamujące działanie CHL na wchłanianie aflatoksyny B1 w modelu komórkowym Caco-2 oraz zdolność CHL do kompleksowania DON. Stąd głównym celem pracy była ocena zdolności

* Sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

² e-mail: marta_mendel@sggw.pl

CHL do ograniczenia wchłaniania DON w modelu izolowanej śluzówki jelita czczego świń.

Badania przeprowadzono na eksplantach błony śluzowej jelita czczego zdrowych, dorosłych krów, które były poddawane rutynowo ubojowi. Wycinki śluzówki jelita inkubowano w buforze Krebsa, w dwukompartmencie zestawie komór (Ussing system) przez 90 minut. Od strony błony śluzowej eksplanty jelita poddawano inkubacji w buforze zawierającym DON (0, 10 lub 30 $\mu\text{g/ml}$) lub DON + CHL (100 $\mu\text{g/ml}$). Od strony błony surowiczej komory wypełnione były czystym buforem inkubacyjnym. Integralność oraz przepuszczalność wycinków oceniano na podstawie pomiaru TEER, stężenia lucifer yellow (LY) i aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Stężenie DON oznaczano w teście ELISA.

Uzyskane wyniki potwierdziły toksyczne działanie DON na błonę śluzową jelita czczego świń. 90-minutowa inkubacja eksplantów jelita w buforze zawierającym DON w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$ doprowadzała do: (i) wzrostu przepuszczalności wycinków dla LY, którego stężenie wynosiło 174% wartości mierzonej podczas inkubacji eksplantów w warunkach kontrolnych, tj. bez dodatku miktotoksyny; (ii) znacznego zmniejszenia wartości TEER, który pod koniec inkubacji wynosił jedynie 34% pomiaru wykonanego na początku doświadczenia. Obie zaobserwowane zmiany dowodzą toksycznego działania DON, który polega na rozszczelnieniu połączeń pomiędzy enterocytami, tzw. T-junction, oraz nasileniu transportu paracelularnego. Natomiast inkubacja wycinków śluzówki w obecności miktotoksyny nie spowodowała wzrostu aktywności LDH, co wyklucza cytotoksyczne działanie DON na komórki błony śluzowej jelita. Dodanie CHL do medium inkubacyjnego zawierającego DON (30 $\mu\text{g/mL}$) nie spowodowało zmiany odczytu TEER, przepuszczalności jelita dla LY, ani wzrostu uwalniania LDH z komórek. Nieoczekiwane zastosowanie CHL nie zmniejszyło wchłaniania DON w eksplantach jelita. Wręcz przeciwnie dodatek CHL do medium inkubacyjnego nasilał ($p < 0.05$) penetrację DON przez jelito. Stężenie DON badane po stronie błony surowiczej eksplantów wynosiło 25 i 55 ng/ml odpowiednio dla wycinków inkubowanych w obecności DON i DON+CHL.

Wpływ wziewnej i ogólnej glikokortykosteroidoterapii na liczebność limfocytów T CD4⁺ regulatorowych i efektorowych u myszy z modelem astmy alergicznej

M. Zuśka-Prot^{1, 2}, T. Maślanka¹

¹ Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

Wprowadzenie i cel: Mimo że wziewne glikokortykosteroidy są rutynowo stosowane w leczeniu astmy oskrzelowej, to ich wpływ na limfocyty T CD4⁺ – a więc komórki odgrywające centralną rolę w patogenezie tej choroby – dolnych dróg oddechowych jest szczątkowo poznany. Celem niniejszych badań było ustalenie i porównanie wpływu wziewnej (cyklezolid; CYK) i ogólnej (metyloprednizolon; MP) glikokortykosteroidoterapii na liczebność limfocytów T CD4⁺ regulatorowych (Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺) oraz efektorowych aktywowanych (Foxp3⁻CD25⁺CD4⁺) w węzłach chłonnych śródpiersiowych (WChŚ) i płucach, a więc odpowiednio w strefach indukcyjnej i efektorowej odpowiedzi immunologicznej, związanej z patogenezą astmy alergicznej.

Materiały i metody: Układ eksperymentu obejmował 4 grupy zwierząt: myszy zdrowe, myszy immunizowane owalbuminą (OVA; model astmy) oraz myszy immunizowane OVA₁ otrzymujące wziewnie CYK lub domięśniowo MP. Materiał badawczy stanowiły limfocyty wyizolowane z WChŚ i płuc. Analizowane parametry obejmowały liczbę bezwzględną limfocytów T o fenotypach Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ i Foxp3⁻CD25⁺CD4⁺. Oznaczenia wykonano z zastosowaniem cytometrii przepływowej.

² e-mail: monika.zuska@gmail.com

Wyniki: Przeprowadzone badania wykazały znaczący wzrost liczby bezwzględnej Foxp3-negatywnych limfocytów T CD25⁺CD4⁺ w WChŚ i płucach myszy astmatycznych nieotrzymujących CYK ani MP, podczas gdy u zwierząt traktowanych lekami liczba komórek z tej subpopulacji nie różniła się znacząco od wartości uzyskanych dla tego parametru u myszy zdrowych. Stwierdzono, że indukcja modelu astmy prowadziła do znaczącego wzrostu liczby bezwzględnej komórek regulatorowych Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ na terenie WChŚ i płuc, przy czym podawanie zarówno CYK, jak i MP zapobiegało temu zjawisku. Nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi lekami w zakresie wpływu na oceniane parametry.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że u podstaw przeciwaastmatycznego działania glikokortykosteroidów leży przeciwdziałanie odpowiedzi immunologicznej na terenie WChŚ, co w efekcie zapobiega rekrutacji aktywowanych efektorowych limfocytów T CD4⁺ na teren płuc. Najwyraźniej skuteczność tych środków w terapii astmy nie jest związana z generowaniem indukowalnych komórek regulatorowych Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺, tak jak to postulowano w innych badaniach.

Wpływ zakażenia wirusem ektromelii na poziom katepsyn i przetwarzanie antygeny w konwencjonalnych komórkach dendrytycznych*

M. Bossowska-Nowicka¹, M. Mielcarska¹, F.N. Toka^{1,2}, M. Romaniewicz³,
M.M. Kaczmarek³, J. Struzik¹, L. Szulc-Dąbrowska^{1,4}

¹ Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie, Polska

² Center for Integrative Mammalian Research, Ross University School of Veterinary Medicine, St. Kitts & Nevis, West Indies

³ Laboratorium Biologii Molekularnej, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Polska

Katepsyny są proteazami endolizosomalnymi, które regulują liczne mechanizmy odporności wrodzonej (np. migrację komórek) oraz nabytej (np. przetwarzanie i prezentację antygeny). Konwencjonalne komórki dendrytyczne (DC) stanowią pomost pomiędzy odpornością wrodzoną i nabytą, i należą do grupy profesjonalnych komórek prezentujących antygen (APC), zdolnych do pobudzania dziewiczych limfocytów T. Katepsyny obecne w DC umożliwiają przetwarzanie egzogenego antygeny i jego prezentację w kontekście cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy II, tym samym powodują aktywację antygenowo-swoistych limfocytów T.

Wirus ektromelii (ECTV) wykształcił szereg mechanizmów modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza i stanowi dogodny model do badania patogenezy zakażeń ortopokswirusowych i innych uogólnionych

* Badania sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego decyzja nr 05-1/KNOW2/2015.

⁴ e-mail: lidia_szulc@sggw.pl

chorób wirusowych. Jako jedyny przedstawiciel rodzaju *Orthopoxvirus*, ECTV produktywnie namnaża się w DC, zaburzając liczne funkcje tych komórek. W niniejszej pracy oceniono wpływ zakażenia ECTV na poziom katepsyn i przetwarzanie antygeny w ustalonej linii konwencjonalnych DC JAWS II. Badania pokazały, że zakażenie ECTV obniżało ekspresję genów katepsyn B, L i S, zwłaszcza w późniejszej fazie zakażenia [24 godziny po zakażeniu (gpz)] w komórkach JAWS II. Spadek ekspresji genów korelował z obniżonym poziomem białek ww. katepsyn. Ponadto wirus zaburzał ekspresję białek regulujących aktywność katepsyn – cystatyny B i C. Barwienie immunofluorescencyjne wykazało, że katepsyna L kolokalizuje, natomiast cystatyna B częściowo kolokalizuje z fabrykami wirusowymi (miejscami replikacji) w czasie trwania całego cyklu replikacyjnego (4-24 gpz). Zakażone DC wykazywały także upośledzoną zdolność do przetwarzania egzogenego antygeny (DQ-OVA). Powyższe wyniki sugerują, że hamowanie ekspresji katepsyn i zaburzenie ich dystrybucji w zakażonych komórkach stanowi dodatkowy element wirusowej modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

W kolejnym etapie badań określono wpływ wyciszenia genów katepsyny B, L i S (metodą siRNA) na tempo replikacji ECTV w komórkach linii JAWS II. Po 48-72 gpz ECTV komórek linii JAWS II zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji katepsyny B i L istotnie zwiększało kinetykę replikacji ECTV. Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że ECTV hamuje ekspresję katepsyn w celu zwiększenia efektywności swojej replikacji. Powyższe badania mogą posłużyć do identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych, opartych na manipulacji katepsyn w odniesieniu do sposobów kontroli zakażenia wirusowego.

Ocena działania immunomodulacyjnego antygenów wydzielanych przez *Fasciola hepatica* (*Fh-ES*)

P. Bąska¹, A. Zawistowska-Deniziak², W. Zygnier³, M. Wiśniewski³

¹ Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, Polska

² Laboratorium Parazytologii Molekularnej Instytutu Parazytologii,
im. W. Stefańskiego, Polska

³ Zakład Parazytologii i Inwazjologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, Polska

Motylica wątrobowa (*Fasciola hepatica*) jest pasożytem ludzi i zwierząt. Straty powodowane przez *F. hepatica* w produkcji zwierzęcej, na skutek obniżonej produkcji mleka, spadku przyrostu masy oraz osłabienia płodności, szacowane są na ok. 3 miliardy dolarów rocznie. Dorosła postać bytuje w przewodach żółciowych odżywiając się krwią, a inwazja może trwać kilka lat. W toku ewolucji pasożyt wytworzył mechanizmy pozwalające skutecznie oszukiwać układ immunologiczny żywiciela. Przywra ta indukuje apoptozę eozynofilów i makrofagów, pobudza rozwój regulatorowych komórek dendrytycznych oraz limfocytów T Foxp3⁺, a także wydzielanie regulatorowych cytokin przez makrofagi. Znacząca część efektu immunomodulacyjnego wywoływana jest przez antygeny aktywnie wydzielane przez pasożyta tzw. antygeny ekskrecyjno-sekrecyjne (*ang.* Excretory Secretory) – *Fh-ES*, w skład których wchodzi m. in. katepsyny, dysmutazy ponadtlenkowe, HDM-1 (Helminth defence molecule-1), enolazy, białka wiążące kwasy tłuszczowe,

¹ e-mail: piotr_baska@sggw.pl

S-transferazy glutationu. Badania wykazują, że *Fh*-ES mogą łagodzić objawy alergii i chorób autoimmunologicznych.

Do tej pory oceniono wpływ *Fh*-ES na stężenie podstawowych mediatorów odpowiedzi immunologicznej (TNF- α , IFN- γ czy IL-4). Niniejsze badania miały rozszerzyć wiedzę nt. czynników wydzielanych przez makrofagi pod wpływem *Fh*-ES. Wykazano, że *Fh*-ES hamują wydzielanie przez makrofagi Ang-2, TNFSF13B, BDNF, CST3, FGF-19, GM-CSF, CD105, ICAM-1, IFN- γ , IGFBP-3, IL-1, IL-10, IL-27, CCL7, FIZZ3, CXCL12, TSP-1, CD31. Badania potwierdzają hipotezę, że *Fh*-ES wykazują działanie hamujące odpowiedź immunologiczną poprzez szereg czynników, które nie były badane w inwazji motylicy wątrobowej.

Alternatywne metody kontroli stosowania antybiotyków u zwierząt*

A. Gajda^{1,2}

¹ Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Polska

Kontrola stosowania leków weterynaryjnych jest ważnym elementem w hodowli zwierząt. W praktyce antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne obok wskazań terapeutycznych, mogą być również bez uzasadnienia, nielegalnie stosowane w profilaktyce. W konsekwencji nadużywanie antybiotyków u zwierząt, może prowadzić do występowania ich pozostałości w żywności, co stanowi potencjalne źródło zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Istotnym problemem dzisiejszych czasów, wynikającym z nieumiejętnego stosowania środków przeciwbakteryjnych jest również rozprzestrzenianie się lekoopornych szczepów bakteryjnych na bardzo szeroką skalę. Mając na uwadze istniejące zagrożenia, poszukuje się nowych, nieinwazyjnych metod przyżyciowej kontroli obecności antybiotyków u świń i u drobiu, pozwalających określić czy w trakcie hodowli antybiotyki stosowane były prawidłowo, zgodnie z zaleceniami lekarza weterynarii. Dotychczas, antybiotyki u zwierząt od których pozyskuje się żywność badane są głównie w tkankach w ramach Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych. Jednak badania te nie dają możliwości przyżyciowego monitorowania stosowania antybiotyków na fermach zwierząt gospodarskich.

Alternatywnym rozwiązaniem dla badania tkanek u świń w kontroli stosowania leków weterynaryjnych wydaje się być wykorzystanie płynu ustnego. W celu wykazania możliwości wykrywania antybiotyków w tym materiale

* Badania sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

² e-mail: anna.gajda@piwet.pulawy.pl

przeprowadzono doświadczenie na zwierzętach, w którym wykazano długie utrzymywanie się oksytetracykliny w płynie ustnym oraz dużą zależność pomiędzy stężeniami w płynie ustnym i w tkankach w dniu karencji zastosowanego leku. Najmniej inwazyjnym narzędziem do walki z nielegalnym stosowaniem antybiotyków u drobiu, wydaje się być badanie piór kurzych, jako alternatywy dla innych matryc biologicznych. Znaczną zaletą badania piór jest rozpoznanie i odtworzenie częstotliwości aplikowania leków u ptaków oraz rozróżnienie legalnego, zgodnie ze wskazaniem podawania, od nielegalnego subterapeutycznego stosowania antybiotyków. Pióra kurze stosowane są także do produkcji pasz dla wielu zwierząt gospodarskich. Jako składnik pasz mogą być źródłem przedostawania się antybiotyków do łańcucha żywnościowego. W celu kontroli stosowania leków weterynaryjnych, przyżyciowo badana jest także woda przeznaczona do pojenia zwierząt. Jednakże, badania wody pozwalają na określenie źródła kontaminacji ewentualnie występującymi lekami, a nie ich pozostałości w organizmie zwierząt.

Niewątpliwą zaletą wykorzystania płynu ustnego u świń, piór do badania u drobiu oraz wody do pojenia zwierząt jest fakt, że pobieranie materiału jest stosunkowo niskiej inwazyjności. Wykorzystanie przedstawionych matryc biologicznych do wykrywania antybiotyków umożliwia pobranie materiału od dużej liczby osobników jednocześnie oraz daje możliwość oceny występowania antybiotyków u dużej liczby zwierząt przez pobranie 1 próbki zbiorczej.

Takie alternatywne rozwiązania pozwoliłyby na ocenę występowania substancji niepożądanych tuż przed ubojem zwierząt. Badanie te mogłoby w znaczący sposób ograniczyć straty, spowodowane koniecznością utylizacji mięsa w przypadku wykrycia antybiotyków w tkankach. Prezentowany sposób kontroli antybiotyków przyczyniłby się do wzrostu bezpieczeństwa żywności, a przez to ochrony zdrowia konsumentów.

Odpowiedź immunologiczna gruczołu sutkowego krów mlecznych na nawracające, chroniczne zapalenie spowodowane przez gronkowce koagulazo-dodatnie lub koagulazo-ujemne*

M. Zalewska^{1,4}, E. Kawecka^{1,2}, P. Brodowska¹, D. Reczyńska¹,
D. Słoniewska¹, S. Marczak³, S. Petrykowski³, E. Bagnicka¹

¹ Zakład Doskonalenia Zwierząt, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
w Jastrzębcu, Polska

² Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie, Polska

³ Zakład Doświadczalny, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Polska

Zapalenie gruczołu mlekowego jest uważane za jedno z największych zagrożeń dobrostanu zwierząt w chowie i hodowli bydła mlecznego. Ponadto choroba ta powoduje znaczne pogorszenie parametrów fizyko-chemicznych mleka, co niesie za sobą duże straty ekonomiczne dla przemysłu mlecznego. Z tego powodu niezwykle istotne jest zrozumienie mechanizmów obronnych gruczołu sutkowego, a szczególnie tkanki wydzielniczej, odpowiedzialnej za sekrecję mleka.

Celem badań było przeanalizowanie wzorów ekspresji genów wybranych białek ostrej fazy (amyloid surowicy – *SAA*, haptoglobina – *Hp*, oraz ceruloplazmina – *Cp*) w zależności od stanu zdrowotnego zwierzęcia oraz rodzaju

* Badania finansowane z grantu nr 2015/17/B/NZ9/01561 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

⁴ e-mail: m.zalewska@ighz.pl

patogenu powodującego zakażenie (gronkowce koagulazo-dodatnie – CoPS i koagulazo-ujemne – CoNS) tkanki wydzielniczej pochodzącej od bydła mlecznego rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Materiał do badań pobrano zarówno ze zdrowych (grupa kontrolna), jak i zakażonych ćwiartek wymienia. Analizę ekspresji genów przeprowadzono z zastosowaniem metody qPCR (LightCycler 480, Roche). Jako gen referencyjny wykorzystano *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego).

Poziom ekspresji genu *Cp* nie różnił się pomiędzy badanymi grupami. Stwierdzono natomiast znaczny wzrost poziomu ekspresji genu *Hp* w próbkach pochodzących z ćwiartek wymienia ze stwierdzoną obecnością CoPS w porównaniu z ćwiartkami wolnymi od bakterii. Nie odnotowano różnic w poziomie transkryptów genu *Hp* ani pomiędzy ćwiartkami zakażonymi CoNS a grupą kontrolną, ani pomiędzy próbkami CoPS a CoNS. W przypadku genu *SAA* stwierdzono znacznie większą ekspresję w próbach CoPS i CoNS w porównaniu do grupy kontrolnej (0,13 vs. 1,62), jednak z powodu znacznej zmienności wewnątrz grup różnice te potwierdzono jedynie na poziomie trendu ($p=0,09$).

Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że poziom ekspresji genu *Hp*, którego produkt białkowy jest jednym z głównych białek ostrej fazy bydła mlecznego, może być wykorzystany jako dodatkowy marker do wczesnego rozpoznania zapalenia gruczołu mlekowego. Ponadto stwierdzono ekspresję, zarówno konstytutywną jak i zwiększoną podczas stanu zapalnego wymienia, genu *Hp* w tkance wydzielniczej gruczołu mlekowego.

