



## **III SYMPOZJUM: ZDROWE ZWIERZĘ - BEZPIECZNA ŻYWNOŚĆ**

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

**Guzowy Piec 25-27 września 2019**



**Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący**

**Konsorcjum Naukowe "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność"**  
*Leading National Research Centre*  
*Scientific Consortium "Healthy Animal - Safe Food"*





**SESJA SPRAWOZDAWCZA ZSD KNOW**  
**„ZDROWE ZWIERZĘ – BEZPIECZNA ŻYWNOŚĆ”**

**III SYMPOZJUM KNOW:**  
**„ZDROWE ZWIERZĘ – BEZPIECZNA ŻYWNOŚĆ”**

**oraz**

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

*Guzowy Piec, 23-27 września 2019 r.*

**Organizatorzy:**

**Krajowy Naukowy Ośrodek Wiedzy (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

Instytut Weterynarii - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

oraz

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie

## **Program Sesji Sprawozdawczej ZSD KNOW**

**23 września 2019r. (poniedziałek)**

Przyjazd, zakwaterowanie.

**19<sup>00</sup> - Kolacja.**

**24 września 2019r. (wtorek)**

**9<sup>30</sup> – 9<sup>40</sup> Otwarcie sesji sprawozdawczej.**

**9<sup>40</sup> – 11<sup>00</sup> Sesja doniesień I** (każde 20 minut wraz z dyskusją).

1. **Luiza Kijewska** (*PIWet- PIB*): Ocena czasu zanikania błękitu metylenowego oraz jego potencjalnych metabolitów w mięśniach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*).
2. **Ilona Kaszak** (*WMW SGGW*): Ocena poziomu biomarkerów nowotworowych CA 15-3 oraz CEA w nowotworach sutka u suk.
3. **Izabela Gregorczyk** (*WMW UW-M*): Wpływ hamowania jądrowego czynnika transkrypcyjnego κB oraz blokady interakcji RANK-L/RANK na wybrane komórki immunokompetentne w przebiegu doświadczalnej astmy alergicznej.
4. **Karolina Dobrzyń** (*IRZiB PAN*): Wpływ steroidów na ekspresję błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy.

**11<sup>00</sup> – 12<sup>30</sup> Przerwa kawowa + sesja plakatowa.**

**12<sup>30</sup> – 13<sup>50</sup> Sesja doniesień II** (każde 20 minut wraz z dyskusją).

5. **Małgorzata Domżańska** (*IRZiB PAN*): Wpływ stanów zapalnych na stopień docierania kwercetyny i jej metabolitów do mózgu.
6. **Anna Gierak** (*PIWet PIB*): Ilościowa ocena ryzyka wprowadzenia wirusa grypy ptaków do Polski.
7. **Paulina Brodowska** (*IGHiZ PAN*): Związek między polimorfizmami genów związanych z układem immunologicznym, cechami funkcjonalnymi i produkcyjnymi krów oraz ich analiza ekonomiczna.
8. **Marta Odynieć** (*WMW UW-M*): Występowanie, charakterystyka biotypowa, serotypowa, molekularna i analiza filogenetyczna szczepów *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* u zwierząt łownych.

**13<sup>50</sup> – 15<sup>30</sup> Przerwa obiadowa.**

**15<sup>30</sup> – 16<sup>30</sup> Sesja doniesień III** (każde 20 minut wraz z dyskusją).

9. **Anna Rykaczewska** (*WMW UW-M*): Wpływ niskich dawek zearalenonu podawanego niedojrzałym płciowo loszkom na ich profil metaboliczny i wskaźniki produkcyjne.
10. **Agata Moroz** (*WMW SGGW*): Zmiany w układzie oddechowym w przebiegu wirusowego zapalenia stawów i mózgu kóz.
11. **Karolina Piekarska** (*PIWet PIB*): Charakterystyka molekularna szczepów poliomawirusa i cirkowirusa gęsiego izolowanych od gęsi w Polsce – badania wstępne.

**19<sup>00</sup> Ognisko.**

**25 września 2019r. (środa)**

**9<sup>30</sup> – 10<sup>30</sup> Wykład końcowy: prof. Piotr Tryjanowski** (*Instytut Zoologii Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*): Kto ma owce ten ma co chce? A kto ma pasję to co?

**10<sup>30</sup> Zamknięcie Sesji Sprawozdawczej i podsumowanie działalności ZSD KNOW** (*prof. Magdalena Król, prof. Tomasz Motyl*).

## Program

### III SYMPOZJUM KNOW: „ZDROWE ZWIERZĘ – BEZPIECZNA ŻYWNOŚĆ”

oraz

### XIII SYMPOZJUM: „GENETYCZNE, FIZJOLOGICZNE I ŚRODOWISKOWE UWARUNKOWANIA ROZRODU I ZDROWIA ZWIERZĄT ORAZ BEZPIECZEŃSTWA I JAKOŚCI ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO”

25 września 2019r. (środa)

15<sup>30</sup> – 17<sup>30</sup> Rada Programowa KNOW.

Przyjazd pozostałych uczestników do Ośrodka „Bajkowy Zakątek” w Guzowym Piecu.

19<sup>00</sup> Spotkanie towarzyskie i rozmowy kularowe - kolacja w formie grilla.

26 września 2019r. (czwartek)

9<sup>00</sup> – 9<sup>15</sup> Otwarcie Sympozjum.

9<sup>15</sup> – 10<sup>00</sup> Wykład I.

**Prof. Magdalena Larska** (*Państwowy Instytut Weterynaryjny PIB*): „Dzika” strona chorób zakaźnych. Dyskusja.

10<sup>00</sup> – 10<sup>45</sup> Wykład II.

**Prof. Marcin Wiśniewski** (*Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW*): *Dirofilaria repens* - badanie interakcji pasożyt - żywiciel z wykorzystaniem nowo poznanych antygenów pasożyta uzyskanych metodami biologii molekularnej. Dyskusja.

10<sup>45</sup> – 12<sup>30</sup> SESJA I (Część I): INNOWACYJNE METODY DIAGNOSTYKI, PROFILAKTYKI I TERAPII CHOROÓB ZWIERZĄT I LUDZI (*Prowadzący: Magdalena Larska, Marcin Wiśniewski, Paweł Lipiński*).

10<sup>45</sup> – 11<sup>15</sup> Sesja doniesień I (każde 10 minut i 5 minut dyskusji):

1. **Edyta Mikuła** (*IRZiBŻ PAN*): Opracowanie elektrochemicznej platformy nanokompozytowej przeznaczonej do zastosowania w biosensorach opartej na łączeniu dwóch różnych materiałów: poli (3,4-etylenodioksytyofenu) (PEDOT) oraz nanocząstek złota (AuNP) lub nanocząsteczek magnetycznych (MNP).
2. **Anna Pikuła** (*PIWet PIB*): Zastosowanie technologii xMAP do jednoczesnego wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu.

11<sup>15</sup> – 11<sup>30</sup> Przerwa kawowa.

**11<sup>30</sup> – 12<sup>30</sup> Sesja doniesień II** (każde 10 minut i 5 minut dyskusji):

3. **Piotr Poznański** (*IGiHZ PAN*): Zmiana potencjału analgetycznego morfiny wywołana premedykacją etanolem u myszy selekcionowanych w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej.
4. **Ewelina Kowalczyk** (*PIWet PIB*): Opracowanie bazy danych dla alkaloidów pirolizydynowych przy wykorzystaniu wysokorozdzielczego spektrometru mas Q-Exactive (Orbitrap) sprzężonego z UHPLC.
5. **Ewelina Szacawa** (*PIWet PIB*): Wstępne wyniki opracowania i optymalizacji metody loop-mediated isothermal amplification (LAMP) do wykrywania *Mycoplasma bovis* u bydła.
6. **Bartłomiej Tykałowski** (*WMW UW-M*): Wpływ uodporniania indyków przeciwko wirusowi krwotocznego zapalenia jelit na wybrane mechanizmy odpowiedzi komórkowej i humoralnej w warunkach dużej presji wirusa terenowego).

**13<sup>00</sup> – 14<sup>00</sup> Obiad.**

**14<sup>00</sup> – 14<sup>45</sup> Wykład III.**

**Prof. Bogdan Lewczuk** (*Wydział Medycyny Weterynaryjnej UW-M*): Badania ultrastruktury komórek, tkanek i narządów w układzie trójwymiarowym oraz w powiązaniu z obrazem z mikroskopii fluorescencyjnej.  
Dyskusja.

**14<sup>45</sup> – 15<sup>30</sup> Wykład IV.**

**Mgr Paweł Leszczyński** (*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN*): Regulation of PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing 3 (Prdm3) gene expression during neurogenesis and beyond.  
Dyskusja.

**15<sup>30</sup> – 16<sup>00</sup> Przerwa kawowa.**

**16<sup>00</sup> – 17<sup>30</sup> SESJA II: BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE ZWIERZĄT GOSPODARSKICH, WOLNO ŻYJĄCYCH ORAZ ŚRODOWISKA** (Prowadzący: Bogdan Lewczuk, Paweł Leszczyński, Mirosław Polak).

**16<sup>00</sup> – 17<sup>15</sup> Sesja doniesień I** (każde 10 minut i 5 minut dyskusji):

1. **Maciej Wójcik** (*IFŻŻ PAN*): Fotoperiod jako czynnik modulujący wpływ endotoksyny bakteryjnej i leptyny na ekspresję genów cytokin prozapalnych i ich receptorów w przedniej części przysadki owcy.
2. **Małgorzata Starowicz** (*IRZiBŻ PAN*): Kształtowanie profilu związków zapachowych oraz ocena sensoryczna polskich miodów pitnych.
3. **Kaja Urbańska** (*WMW SGGW*): Znaczenie izoform dehydrogenazy mleczanowej w nowotworzeniu.
4. **Marta Giergiel** (*PIWet PIB*): Monitoring chemicznych pozostałości w wątrobie lisa rudego w Szkocji.
5. **Liliana Rytel** (*WMW UW-M*): Wpływ bisfenolu A na neurochemiczną charakterystykę włókien nerwowych zlokalizowanych w ścianie macicy świni domowej.

**20<sup>00</sup> Spotkanie towarzyskie i rozmowy kularowe.**

**27 września 2019r. (piątek)**

**8<sup>30</sup> – 9<sup>15</sup> Wykład V.**

**Prof. Aneta Andronowska** (*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN*): Chemokiny jako modulatory funkcji rozrodczych u świni.

Dyskusja.

**9<sup>15</sup> – 13<sup>00</sup> SESJA III: GENETYCZNE, EPIGENETYCZNE I FIZJOLOGICZNE PODSTAWY DOSKONALENIA CECH PRODUKCYJNYCH I FUNKcjONALNYCH ORAZ ZDROWIA ZWIERZĄT** (*Prowadzący: Aneta Andronowska, Andrzej Herman, Tomasz Sadkowski*).

**9<sup>15</sup> – 10<sup>45</sup> Sesja doniesień I** (każde 10 minut i 5 minut dyskusji):

1. **Marcin Barszcz** (*IFiZZ PAN*): Wpływ rodzaju i poziomu inuliny w paszy na stężenie mucyn w okrzężnicy prosiąt.
2. **Małgorzata P. Majewska** (*IFiZZ PAN*): Wpływ dodatku tanin hydrolizujących w dawkach pokarmowych dla owiec na populację orzęsków oraz aktywność enzymatyczną treści żwacza.
3. **Joanna Bujak** (*WMW SGGW*): Rola kanału jonowego TRPV1 w funkcjonowaniu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psa domowego (*Canis lupus familiaris*).
4. **Paula Kiełbik** (*WMW SGGW*): Nanocząstki ZnO domieszkowane Fe jako potencjalne źródło egzogenego żelaza u zwierząt.
5. **Aleksandra Szczepkowska** (*IRZiBŻ PAN*): Okołodobowa ekspresja czynnika VEGF w mikronaczyniach krwionośnych mózgu.

**11<sup>15</sup> – 11<sup>30</sup> Przerwa kawowa.**

**11<sup>30</sup> – 13<sup>00</sup> Sesja doniesień II** (każde 10 minut i 5 minut dyskusji):

6. **Natalia Ziółkowska** (*WMW UW-M*): Ekspozycja na światło niebieskie powoduje spadek liczby neuronów zwojowych zawierających melanopsynę oraz ich włókien nerwowych w siatkówkach szczurów.
7. **Katarzyna Filimonow** (*IGiHZ PAN*): Potential role of KLF (Krupel-like factor) protein family in the preimplantation rabbit embryo development.
8. **Dawid Winiarczyk** (*IGiHZ PAN*): Regulacja apoptozy w oocyty i przedimplantacyjnym zarodku myszy.
9. **Przemysław Gilun** (*IRZiBŻ PAN*): Wpływ CO na epigenetyczną regulację promotorów wybranych genów zegara biologicznego Per 2 i Clock u świni domowej.

**13<sup>00</sup> Zakończenie sympozjum i obiad.**

## **SESJA SPRAWOZDAWCZA ZSD KNOW**

## Ocena czasu zanikania błękitu metylenowego oraz jego potencjalnych metabolitów w mięśniach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*)\*

L. Kijewska<sup>1,2</sup>, K. Mitrowska<sup>1</sup>, A. Posyniak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Błękit metylenowy (MB) jest barwnikiem fenotiazynowym stosowanym na całym świecie w akwakulturze jako środek przeciwgrzybiczy i przeciwpasożytniczy. Jego potencjalnymi metabolitami są inne barwniki tiazynowe takie jak azur A (AZA), azur B (AZB), azur C (AZC) i tionina (TH). MB według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IRAC) został zaklasyfikowany do trzeciej grupy toksyczności, tj. substancji niemożliwych do zaklasyfikowania jako rakotwórcze dla człowieka. Jednak ze względu na działanie toksyczne w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych jego stosowanie w hodowli ryb przeznaczonych do spożycia nie jest dozwolone, a obecność jego pozostałości w mięśniach ryb po potencjalnym nielegalnym stosowaniu powinna być kontrolowana. Dotychczasowe badania nad metabolizmem i czasem zanikania błękitu metylenowego w organizmach ryb przeprowadzono wyłącznie na sumach i nie odnotowano żadnych danych dotyczących pstrąga tęczowego. Dlatego celem doświadczenia była ocena czasu zanikania barwnika w mięśniach pstrąga tęczowego po kąpieli w MB.

Pstrągi (150) poddano 3-godzinnej kąpieli w roztworze MB o stężeniu 2 mg/l. Po zakończeniu kąpieli ryby przeniesiono do zbiornika z czystą wodą. W regularnych odstępach czasu pobierano grupy 10 ryb które następnie usypiano. Grupę kontrolną stanowiło 10 ryb pobranych przed rozpoczęciem kąpieli w roztworze barwnika. Tkanki mięśniowe każdej grupy ryb analizowano następnie pod kątem ilościowego oznaczenia MB, AZA, AZB, AZC i TH za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Zastosowana metoda analityczna została poddana walidacji zgodnie z wytycznymi określonymi w Decyzji Komisji 657/2002/WE.

Maksymalne stężenie MB w tkance mięśniowej ryb zostało oznaczone w pierwszej godzinie po kąpieli. Błękit metylenowy był absorbowany w mięśniach w 5% i metabolizowany do AZB, oraz w mniejszym stopniu do AZA. Stosunek stężenia AZB do MB po zakończeniu kąpieli wynosił 50%, a stosunek AZA do MB 20%. Czas eliminacji barwnika z mięśni (< granicy oznaczalności metody badawczej LOQ = 0,25 µg /kg) został osiągnięty w 24 godzinie po zakończeniu kąpieli.

Doświadczenie pokazuje, że sama substancja macierzysta MB jest głównym markerem pozostałości w mięśniach pstrąga tęczowego. Jednocześnie potwierdza, że inne barwniki z grupy barwników fenotiazynowych takie jak AZA i AZB są metabolitami MB.

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

2 - e-mail: [luiza.kijewska@piwet.pulawy.pl](mailto:luiza.kijewska@piwet.pulawy.pl)

## Ocena poziomu biomarkerów nowotworowych CA 15-3 oraz CEA w nowotworach sutka u suk\*

I. Kaszak<sup>1</sup>, M. Czopowicz<sup>2</sup>, I. Dolka<sup>3</sup>, P. Jurka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chorób Małych Zwierząt z Kliniką, <sup>2</sup>Samodzielna Pracownia Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej, <sup>3</sup>Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

**Wstęp:** Nowotwory gruczołu sutkowego suk (NGSs) są drugim, najczęściej występującym nowotworem u psów [1]. Dodatkowo, prawie 50 % NGSs stanowią zmiany złośliwe, więc jest to poważny problem kliniczny. Ze względu na podobne cechy immunohistochemiczne NGSs oraz raka piersi u kobiet stwierdzono, iż można rozważyć ocenę przydatności tych biomarkerów u suk. Biomarkery są to substancje (zazwyczaj białka), których poziom może być mierzony we krwi jak również w innych tkankach (m. in. w guzie), zaś otrzymany wynik może zapewnić nam informację o obecności choroby, odpowiedzi na leczenie oraz o dalszym rokowaniu u pacjenta. U kobiet najczęściej badanymi biomarkerami raka piersi są CEA oraz CA 15-3 [2]. W weterynarii przeprowadzono zaledwie kilka badań, w których potwierdzono wykrywalność i wstępnie oznaczono stężenie tych biomarkerów u suk z NGSs [2,3,4].

**Cel badań:** Celem badań jest oznaczenie poziomu CEA oraz CA 15-3 we krwi oraz w tkance nowotworowej u suk z NGSs jak również w krwi u suk zdrowych oraz u suk po przeprowadzonym zabiegu mastektomii i porównanie tych wyników.

**Metodyka:** Do oznaczenia poziomu ekspresji CEA oraz CA 15-3 w surowicy zastosowano komercyjne testy ELISA (CA 15-3 Canine ELISA KIT, MyBiosource oraz CEA Canine ELISA Kit, MyBiosource). Poziom ekspresji CEA oraz CA 15-3 w tkankach nowotworowych oznaczono poprzez metodę immunohistochemiczną z użyciem swoistych dla psa przeciwciał (Ca 15-3 (MUC1), NovusBio oraz CEA, Cell Marque).

**Wyniki:** W badaniach ELISA otrzymano statystycznie istotną różnicę w ekspresji CEA oraz CA 15-3 u psów zdrowych oraz u psów z NGSs (ekspresja ta była znacznie niższa u psów zdrowych). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy w ekspresji CEA oraz CA 15-3 pomiędzy nowotworami złośliwymi a łagodnymi. We wstępnych badaniach immunohistochemicznych zauważono wyższą ekspresję CEA oraz CA 15-3 w guzach złośliwych w porównaniu do zmian łagodnych.

**Wnioski:** Biomarkery CEA oraz CA15-3 są wykrywalne zarówno w surowicy, jak i tkankach u psów. Najlepszą metodą oznaczania ich ekspresji we krwi jest zastosowanie komercyjnych testów ELISA. Natomiast, oznaczanie ekspresji CEA oraz CA 15-3 w tkankach nowotworowych metodą immunohistochemiczną jest dobrą metodą zarówno ilościową jak i jakościową. Porównanie ekspresji tych biomarkerów w krwi i w tkankach wydaje się kluczowe do określenia stadium zaawansowania choroby. CEA oraz CA 15-3 wydają się być dobrymi biomarkerami do wczesnej diagnostyki zmian rozrostowych gruczołu sutkowego u suk.

### Piśmiennictwo:

1. Soremno K. Canine mammary gland tumors. Vet Clin Am Small Anim Pract. 2003;33:573-96
2. Ledecy V, Valencakova Agyagosova A, Lepej J. Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen values with the radioimmunoassay method in healthy females dogs. Vet Med (Praha). 2013;58:277-83.
3. Campos LC, Lavallo GE, Estrela-Lima A, Melgaco de Faria JC, Guimaraes JE, Dutra AP et al. CA15.3, CEA, and LDH in dogs with malignant mammary tumors. J Vet Int Med. 2012;26:1383-8.
4. Manuali E, De Giuseppe A, Feliziani F, Forti K, Casciari C, Marchesi MC et al. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. BMC Vet Res. 2012;8:86.

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

# **Wpływ hamowania jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B oraz blokady interakcji RANK/RANK-L na wybrane komórki immunokompetentne w przebiegu doświadczalnej astmy alergicznej**

I. Gregorczyk, T. Maślanka

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

**Cele:** (1) poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za przeciwastmatyczny efekt hamowania aktywności jądrowego czynnika  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) za pomocą hamowania kinazy inhibitora NF- $\kappa B$  (IKK) lub blokowania translokacji NF- $\kappa B$  do jądra komórkowego; (2) ustalenie, czy zablokowanie oddziaływania między RANK (receptor aktywujący NF- $\kappa B$ ) a RANK-L (ligand RANK) może przynosić korzyści terapeutyczne w leczeniu astmy & przebadanie wpływu tej blokady na odpowiedź immunologiczną ze strony komórek odgrywających główną rolę w patogenezie choroby; (3) porównanie skuteczności blokady wszystkich trzech testowanych celów terapeutycznych wzajemnie ze sobą oraz z adekwatnym lekiem rutynowo stosowanym w terapii astmy alergicznej.

**Materiały i metody:** (I) grupy kontrolne/odniesienia: myszy zdrowe, myszy z modelem alergicznej astmy (MAA) wywołanym owoalbuminą (OVA) i myszy immunizowane OVA, otrzymujące metyloprednizolon (MP; glikokortykosteroid o potwierdzonej skuteczności w astmie); (II) grupy eksperymentalne: myszy immunizowane OVA otrzymujące BMS-345541 (inhibitor IKK) lub dehydroksymetyloepoksychinomycynę (DHMEQ; inhibitor translokacji NF- $\kappa B$ ) lub osteoprotegerynę (OPG; antagonistą RANK-L). Materiał do badań stanowiły limfocyty wyizolowane z węzłów chłonnych śródpiersiowych (MLN), płuc i popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF). Analizę immunofenotypową przeprowadzono przy użyciu cytometrii przepływowej. Wpływ blokady badanych celów terapeutycznych na rozwój zapalenia alergicznego dróg oddechowych oparto o punktową ocenę zmian histopatologicznych w płucach oraz o ilościowe badanie składu BALF.

**Wnioski:** (1) blokada interakcji RANK/RANK-L zapobiega rozwojowi MAA; (2) zahamowanie aktywacji NF- $\kappa B$  - poprzez blokadę IKK lub translokacji tego czynnika do jądra komórkowego - jak i blokada interakcji RANK/RANK-L dają taki sam efekt przeciwastmatyczny w przebiegu MAA. Uzyskane wyniki sugerują, że blokada w/w celów terapeutycznych wydaje się mieć w tym zakresie pewną przewagę nad glikokortykosteroidem o potwierdzonej skuteczności klinicznej w astmie alergicznej; (3) testowane cele terapeutyczne oraz podawanie MP zapobiegają indukowanej immunizacją ekspansji klonalnej CD4<sup>+</sup> limfocytów T efektorowych (Teff) w MLN. W efekcie tego nie powstają komórki Th2 i Th17, a więc komórki prozapalne odgrywające centralną rolę w rozwoju choroby. Efekt ten częściowo jest następstwem ograniczenia odpowiedzi ze strony prozapalnych komórek dendrytycznych CD11b<sup>+</sup> w MLN, a częściowo wynika z przeciwdziałania indukowanej immunizacją proliferacji CD4<sup>+</sup> komórek Teff w MLN; (4) zarówno zahamowanie translokacji NF- $\kappa B$ , jak i blokada interakcji RANK/RANK-L, ale nie zahamowanie IKK i podawanie MP, mogą wywierać bezpośredni hamujący wpływ na produkcję cytokin efektorowych komórek Th2 (IL-4 i IL-10) i Th17 (IL-17); (5) działanie przeciwastmatyczne wynikające z zahamowania aktywacji NF- $\kappa B$  - bez względu na to, czy poprzez inhibicję IKK, czy blokadę translokacji tego czynnika do jądra komórkowego - i blokady interakcji RANK/RANK-L nie jest pośredniczone przez zwiększoną rekrutację naturalnych komórek regulatorowych (Treg) do MLN i/lub płuc, ani poprzez lokalne generowanie indukowalnych komórek Treg, ani też w wyniku wzbudzenia produkcji IL-10 i TGF- $\beta$  przez komórki Treg; (6) sygnalizacja RANK/RANK-L może być zaangażowana w patogenezę astmy alergicznej. **Implikacje kliniczne:** lokalna blokada interakcji RANK/RANK-L w obrębie układu oddechowego - tj. uzyskiwana za pomocą wziewnego podawania antagonisty RANK-L - może stanowić nowatorski cel terapeutyczny w leczeniu astmy alergicznej.

## Wpływ steroidów na ekspresję błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy\*

K. Dobrzyń<sup>1</sup>, M.K. Kowalik, J. Kotwica

*Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

Progesteron (P4) wpływa na komórki docelowe na drodze genomowej, przez swoje receptory jądrowe (PGR) oraz na drodze pozagenomowej, przez błonowe receptory P4: PGRMC (*progesterone membrane receptor component*) 1 i 2 oraz mPR (*membrane progestin receptor*)  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Dotychczas wykazano obecność mRNA i białka dla PGRMC1, PGRMC2 oraz mPR $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  w ciałku żółtym, macicy oraz łożysku krowy. Ponadto, wykazano zmienną ekspresję tych receptorów w trakcie cyklu rujowego oraz ciąży. Nie znane są czynniki, które mogą mieć udział w regulacji ich ekspresji w komórkach. Dlatego też celem badań było określenie: (a) wpływu hormonów steroidowych na ekspresję błonowych receptorów P4 oraz (b) możliwej drogi działania P4 w łożysku.

Materiałem do badań były skrawki placentomów pozyskane od krów będących w II trymestrze ciąży. W Zadaniu 1 skrawki inkubowano z: (a) P4 ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M), (b) estradiolem (E2;  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M), (c) P4 łącznie z E2 ( $10^{-5}/10^{-8}$ ,  $10^{-6}/10^{-9}$ ,  $10^{-7}/10^{-10}$  M), kwasem arachidonowym (AA;  $10^{-5}$  M), natomiast w Zadaniu 2 z: (a) P4 ( $10^{-5}$  M); (b) aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml – bloker transkrypcji); (c) RU 486 (mifepriston;  $10^{-5}$  M; inhibitor jądrowego receptora P4); (d) AG 205 ( $2 \times 10^{-5}$  M; inhibitor PGRMC1); (e) koniugatem P4-BSA (10, 100 ng/ml; nie przenika przez błonę komórkową) oraz P4 łącznie z każdym inhibitorem przez 6 i 24 h ( $n=5$  dla każdego czasu inkubacji). Po zakończonej inkubacji oznaczono: (1) przeżywalność komórek przy użyciu testu Alamar Blue, (2) stężenie P4, E2 oraz prostaglandyny (PG) E2 i F2 $\alpha$  metodą enzymatyczno-immunologiczną, (3) poziom mRNA dla błonowych receptorów P4 za pomocą Real Time PCR.

Wykazano, że P4 we wszystkich podanych dawkach oraz P4 ( $10^{-5}$  M) podany łącznie z E2 ( $10^{-8}$  M), ActD, RU 486, AG 205 oraz koniugatem P4-BSA obniżył ( $p<0,05$ ) jedynie ekspresję genu mPR $\gamma$  po 6 h inkubacji. Uzyskane wyniki wskazują, że P4 hamuje ekspresję genu mPR $\gamma$  w łożysku krowy, natomiast E2 podany samodzielnie nie wpływa na ekspresję tego receptora i nie modyfikuje działania P4. Ponadto, otrzymane dane sugerują, że P4 na drodze genomowej i niegenomowej może regulować ekspresję mPR $\gamma$  i w ten sposób wpływać na funkcje łożyska.

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

1 - e-mail: [k.dobrzyn@pan.olsztyn.pl](mailto:k.dobrzyn@pan.olsztyn.pl)

# Wpływ stanów zapalnych na stopień docierania kwercetyny i jej metabolitów do mózgu\*

M. Domżańska<sup>1</sup>, J. Skipor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

**Wstęp.** Flawonoidy spożywane z dietą, w tym kwercetyna (Q), mogą działać ochronnie na komórki nerwowe zapobiegając szkodliwemu działaniu stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych. Neuroprotektoryjne działanie Q zależy od stopnia jej docierania do mózgu, regulowanego na poziomie barier mózgowia. Badania prowadzone w Instytucie wykazały, że aglikon Q i jej biologicznie aktywna metylowana pochodna -izoramnetyna (IR) są obecne w płynie mózgowo-rdzeniowym (płyn m-r) u owiec otrzymujących dożwaczowo preparat bogaty w glukozydy Q (w krwi obecne koniugaty Q oraz niewielkie ilości aglikonów Q i IR). Aglikon Q był obecny w płynie m-r również u owiec, którym dożylnie podano mieszaninę metabolitów Q nie zawierającą jej aglikonu. Wskazuje to na przechodzenie Q i IR przez bariery mózgowia, i co najważniejsze, na możliwość lokalnej dekonjugacji glukuronidów Q. Potencjalnym miejscem dekonjugacji wydaje się być splot naczyniówkowy komór mózgu (SN), w którym zlokalizowana jest bariera krew-płyn m-r. W SN stwierdzono aktywność  $\beta$ -glukuronidazy (GUSB) oraz akumulację 3-glukuronidu Q (Q3GA), głównego metabolitu Q w krwi człowieka. W SN rezydują również komórki układu odpornościowego, które wykazują aktywność GUSB. Stany zapalne stymulują aktywność GUSB, jak również zwiększają ekspresję chemokin w SN, co prowadzi do wzrostu napływu komórek układu odpornościowego do SN i potencjalnie zwiększa możliwość lokalnej dekonjugacji Q3GA. Celem pracy jest weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że stan zapalny wpływa na stopień dekonjugacji metabolitów Q i jej docierania do mózgu. Aby zrealizować powyższy cel wyznaczono szczegółowe zadania badawcze:

*Zadanie 1.* Określenie wpływu stanu zapalnego na ekspresję mRNA chemokin i *GUSB* oraz na aktywność GUSB w SN.

*Zadanie 2.* Określenie wpływu stanu zapalnego na aktywność GUSB w krwi i w płynie m-r.

*Zadanie 3.* Określenie wpływu stanu zapalnego na profil Q i jej metabolitów w krwi i w płynie m-r.

*Zadanie 4.* Określenie wpływu stanu zapalnego na akumulację Q3GA w SN.

**Materiały i metody.** *Zadanie 1.* W SN pobranych od owiec uśmiercanych w 4, 8 i 12 godz. od podania płynu fizjologicznego (NaCl)/lipopolisacharydu (LPS, w dawce 400 ng/kg masy ciała (mc)) oznaczono ekspresję mRNA *GUSB* oraz aktywność GUSB. *Zadanie 2 i 3.* Przeprowadzono dwie sesje pobierania płynu m-r i krwi od owiec (n=10), którym w sesji I dożylnie (iv.) podano NaCl a następnie po 3 godz. Q3GA (iv. w dawce 6 mg/60 kg mc) oraz w sesji II podano LPS a następnie po 3 godz. Q3GA. W krwi i płynie m-r określono aktywność GUSB metodą kolorymetryczną oraz stężenie Q i jej metabolitów metodą HPLC/MS/MS. *Zadanie 4.* W SN owiec otrzymujących iv. NaCl i Q3GA (w dawce 0,2 mg/kg mc, n=3) i LPS i Q3GA (n=3) oraz w linii komórek nabłonka SN określono stężenie (akumulację) Q i jej metabolitów metodą HPLC/MS/MS.

**Wyniki.** *Zadanie 1.* Nie stwierdzono wpływu LPS na ekspresję mRNA *GUSB* w SN w 3, 8 i 14 godz. od podania LPS, wykazano natomiast istotny ( $p < 0,05$ ) wzrost aktywności GUSB w 3 godz. od podania LPS. *Zadanie 2.* W wyniku podania LPS stwierdzono istotny ( $p < 0,05$ ) wzrost aktywności GUSB w osoczu krwi, natomiast nie zaobserwowano zmiany aktywności GUSB w płynie m-r. *Zadanie 3.* Trwają oznaczenia stężenia Q i jej metabolitów w osoczu krwi i w płynie m-r. *Zadanie 4.* W obu grupach nie wykazano obecności Q3GA w SN pobranych od owiec w 4 godz. od podania Q3GA. W komórkach SN hodowanych w medium z dodatkiem Q3GA i pozyskiwanych poprzez zeszkrobienie stwierdzono obecność Q3GA, natomiast w komórkach pozyskiwanych poprzez trypsynizację stwierdzono tylko śladowe ilości Q3GA.

**Wnioski.** Stan zapalny, wywołany jednorazowym podaniem LPS, stymuluje aktywność GUSB w krwi oraz w SN ale nie w płynie m-r. Q3GA akumuluje się na powierzchni komórek nabłonka SN.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.  
e-mail: [m.oleszkiewicz@pan.olsztyn.pl](mailto:m.oleszkiewicz@pan.olsztyn.pl)

## Ilościowa ocena ryzyka wprowadzenia wirusa grypy ptaków do Polski\*

A. Gierak<sup>1</sup>, K. Śmietanka<sup>2</sup>, C.J.de Vos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Epidemiologii i Oceny Ryzyka, <sup>2</sup>Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny-  
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

<sup>3</sup>*Department of Bacteriology and Epidemiology, Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad, The Netherlands*

Podlegająca obowiązkowi zwalczania wysoce zjadliwa grypa ptaków (HPAI) oraz nisko zjadliwa grypa ptaków (LPAI) podtypów H5 i H7 może stanowić poważne zagrożenie dla przemysłu drobiarskiego. Przebieg choroby u drobiu uzależniony jest od szczepu wirusa wywołującego zakażenie i może być bardzo zróżnicowany – od postaci łagodnych objawiających się spadkiem nieśności jaj oraz zaburzeniami ze strony układu pokarmowego i oddechowego do formy ostrej ogólnoustrojowej ze śmiertelnością dochodzącą u ptaków grzebiących do 100%. U ptaków wodnych możliwy jest bezobjawowy przebieg choroby.

Potencjalnymi drogami wprowadzenia wirusa do Polski są sezonowe migracje dzikich ptaków, legalny i nielegalny handel żywym drobiem oraz produktami drobiowymi. Dużą rolę w rozprzestrzenianiu wirusa może też odgrywać czynnik ludzki. Przypadki wprowadzenia wirusa do Polski za pośrednictwem importu oraz migracji dzikich ptaków były w przeszłości potwierdzone, jednakże do tej pory nie podjęto próby przeprowadzenia ilościowej oceny ryzyka wprowadzenia wirusa.

Celem niniejszej pracy było oszacowanie wartości prawdopodobieństwa wprowadzenia LPAI za pośrednictwem importu drobiu, określenie tempa rozprzestrzenienia się wirusa HPAI w populacji dzikich ptaków wodnych obecnych na obszarze Zatoki Gdańskiej po jego hipotetycznym wprowadzeniu w czasie sezonowych migracji dzikich ptaków oraz wyznaczenie obszarów podwyższonego ryzyka występowania ognisk choroby u drobiu fermowego.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że ryzyko wprowadzenia wirusa LPAI za pośrednictwem importu drobiu jest niskie, a krajami, które przyczyniają się do wzrostu ryzyka są Niemcy, Holandia i Czechy.

Bazując na oszacowanej liczbie ptaków wodnych obecnych na obszarze Zatoki Gdańskiej w poszczególnych miesiącach jesiennego i wiosennego sezonu migracyjnego oraz w okresie zimowania, można stwierdzić, że liczba ptaków wrażliwych niezbędna do rozprzestrzenienia choroby występuje rzadko. W przypadku występowania dużych skupisk dzikich ptaków rozprzestrzenienie choroby jest możliwe, przewidywana maksymalna liczba zakażonych ptaków obecnych na obszarze może wynosić wtedy około 20 sztuk, dlatego występowanie obszarów o podwyższonej koncentracji dzikich ptaków w pobliżu ferm przyzagrodowych o niskim poziomie bioasekuracji może stwarzać wysokie ryzyko wprowadzenia wirusa do gospodarstwa.

Czynnikami ryzyka, których obecność wiąże się z występowaniem grypy ptaków u drobiu szczególnie w wysoce patogennej formie wywołanej przez wirusy podtypu H5Nx, są: zagęszczenie poszczególnych gatunków drobiu domowego, bliskość rzek i zbiorników wodnych, gęstość zaludnienia, bliskość dróg. Obszarami o największym ryzyku wystąpienia ogniska grypy ptaków są niektóre rejony centralnej, wschodniej i zachodniej części kraju, a w szczególności obszary znajdujące się na terytorium województwa wielkopolskiego.

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

1 – e-mail: [anna.gierak@piwet.pulawy.pl](mailto:anna.gierak@piwet.pulawy.pl)

## **Związek między polimorfizmami genów związanych z układem immunologicznym, cechami funkcjonalnymi i produkcyjnymi krów oraz ich analiza ekonomiczna\***

P. Brodowska<sup>1,5</sup>, A. Tormod<sup>2</sup>, K. Żukowski<sup>3</sup>, R. Grochowska<sup>4</sup>, E. Bagnicka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Zak. Doskon. Zwierząt i Nutrigen., Jastrzębiec*

<sup>2</sup>*Norweski Uniwersytet Przyrodniczy, Wydz. Nauk o Zwierzętach i Akwakulturze, Ås*

<sup>3</sup>*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Hodowli Bydła, Balice*

<sup>4</sup>*Instytut Ekonomiki Rol. i Żyw., PIB, Zak. Ekonomiki Przemysłu Spoż., Warszawa*

Zapalenie gruczołu mlekowego krów wciąż stanowi problem w populacji bydła mlecznego, powodując starty ekonomiczne w hodowli i przemyśle mleczarskim. Dlatego selekcja oparta na markerach genetycznych (np. MAS - *Marker Assisted Selection*) w celu poprawy jakości mleka powinna obejmować również cechy funkcjonalne o niskiej odziedziczalności – odporność na zapalenie wymienia. Celem pracy była analiza związku SNP zlokalizowanych w lub w pobliżu genów związanych z układem odpornościowym oraz z wydajnością mleka i jego składem (wydajność białka, tłuszczu, laktozy i suchej masy, mocznik, BHB, zawartość białka, tłuszczu, laktozy i suchej masy, profil kwasów tłuszczowych) oraz zawartością LKS w celu zidentyfikowania markerów cech produkcyjnych i funkcjonalnych, przede wszystkim związanych z odpornością na zapalenie wymienia. Drugim celem była analiza ekonomiczna opłacalności hodowli zwierząt z poszczególnymi wariantami SNP. Badanie przeprowadzono na 300 krowach rasy polskiej hf odmiany czarno-białej, utrzymywanych w trzech stadach położonych w Centralnej Polsce. Dane fenotypowe dotyczące dziennej wydajności mlecznej i jej składu (8090 rekordów) i informacje rodowodowe (7036 osobników urodzonych w latach 1997–2017) uzyskano z PFHBPM. Średnia dzienna wydajność mleczna krów wynosiła 9400 litrów za laktację, przy średniej zawartości tłuszczu i białka – 4,18% i 3,49%. Krowy żywiono systemem TMR, zgodnie ze standardami INRA. DNA wyizolowano z cebulek włosów a następnie genotypowano za pomocą mikromacierzy *BeadChip Bovine 50k v3*. Dane ekonomiczne dotyczące kosztów bezpośrednich zostały udostępnione przez właścicieli stad. Wstępną analizę przeprowadzono w programie Plink 2.0, aby wybrać SNP istotnie związane z analizowanymi cechami, w oparciu o dostępne informacje, jednak bez uwzględnienia numeru i stadium laktacji oraz danych rodowodowych. Następnie wykonano analizę wariancji w programie SAS z procedurą MIXED, z jednocechowym mieszanym modelem powtarzalnościowym, uwzględniającym numer i stadium laktacji. Kolejną analizę wykonano w programie DMU4 (metoda BLUP) z jednocechowym, mieszanym modelem zwierzęcym w celu oszacowania parametrów genetycznych cech i rozwiązań dla wariantów SNP. Obliczenia ekonomiczne (nadwyżka bezpośrednia, opłacalność, koszty bezpośrednie) oparto na danych rzeczywistych według metodologii AGRO KOSZTY (IERiGŻ). Trzydzieści jeden SNP było związanych z cechami mleka i cechami funkcjonalnymi. Badane SNP były zlokalizowane w obrębie lub blisko genów (nie więcej niż 5 ml. nt.), które są związane z układem odpornościowym: *CXCR4*, *IGF1*, *ADGRB1*, *MAPK15*, *TLR4* i cechami produkcyjnymi: *DGAT*, *GPIHBP1*. Wybrane geny można zaproponować do stosowania w MAS. Analiza ekonomiczna potwierdziła opłacalność hodowli krów o określonych genotypach. Zastosowanie MAS może poprawić wydajność mleczną i jej skład, wpływając pozytywnie na dobrostan zwierząt i zyski ekonomiczne.

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

5 – e-mail: [p.brodowska@ighz.p.l](mailto:p.brodowska@ighz.p.l)

# Występowanie, charakterystyka biotypowa, serotypowa, molekularna i analiza filogenetyczna szczepów *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* u zwierząt łownych\*

M. Odyniec<sup>1,3</sup>, A. Bancercz-Kisiel<sup>1</sup>, P. Socha<sup>2</sup>, W. Szweda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup> Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Pałeczki *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* są czynnikami etiologicznymi jersiniozy, stanowiąc trzecią co do częstości przyczynę zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi. Powszechnie za jeden z głównych rezerwuarów chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* uważana jest trzoda chlewna, aczkolwiek coraz częściej jako źródło zakażenia wskazuje się inne gatunki zwierząt.

Celem pracy była ocena występowania oraz charakterystyka szczepów *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* izolowanych od niebadanych dotychczas (lub badanych w niewielkim stopniu) gatunków zwierząt wolno żyjących. Pobrano wymazy z prostnicy od danieli wolno żyjących i hodowlanych oraz zwierząt towarzyszących danielom w jednej z badanych hodowli. Dodatkowo pobrano wymazy z kloaki od 8 z 13 gatunków dzikiego ptactwa odławianego w Polsce. Badania opierały się na wykrywaniu i charakterystyce pozyskanych szczepów. Po wstępnych badaniach bakteriologicznych poszukiwano charakterystycznych dla poszczególnych gatunków bakterii markerów zjadliwości w postaci fragmentów genów *ail*, *ystA*, *ystB*, *ystC* *Y. enterocolitica* oraz *inv* i *wzz* *Y. pseudotuberculosis*. Następnie dokonywano analizy filogenetycznej, określano bioserotyp i wrażliwość na chemioterapeutyki wyizolowanych szczepów.

Przeprowadzone badania molekularne umożliwiły potwierdzenie przynależności do gatunku *Y. enterocolitica* tylko w przypadku 23 szczepów z 368 wstępnie wyselekcjonowanych przy użyciu badań bakteriologicznych. Szczepy należące do *Y. enterocolitica* wyizolowano od 6 z 15 badanych gatunków zwierząt: danieli wolno żyjących i hodowlanych, kuców szetlandzkich, muflonów europejskich oraz łysiek zwyczajnych, cyraneczki zwyczajnej i głuszców zwyczajnych. Wszystkie wyizolowane szczepy *Y. enterocolitica* charakteryzowały się obecnością fragmentu genu *ystB*. Od żadnego z badanych zwierząt nie wyizolowano szczepów *Y. pseudotuberculosis*.

Analiza biotypowa wykazała, iż zróżnicowanie wyizolowanych szczepów *Y. enterocolitica* pod względem biotypu było niewielkie. Zdecydowana większość – 22 szczepy (95,7%) należała do biotypu 1A. Jeden (4,3%) szczep wykazywał cechy charakterystyczne dla biotypu 1B. Badania serotypujące wykazały, iż zdecydowana większość – 16 szczepów (69,6%) nie aglutynowała z żadną z użytych surowic diagnostycznych. Ocenie wrażliwości na chemioterapeutyki poddano wszystkie potwierdzone molekularnie szczepy *Y. enterocolitica*. Najwięcej badanych szczepów – 17 (73,9%), charakteryzowało się wrażliwością na cyprofloksacynę. Wszystkie 23 badane szczepy *Y. enterocolitica* wykazały oporność na amoksylicynę z kwasem klawulanowym, ampicylinę i cefaleksynę.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż daniela, muflon europejski, kuce szetlandzkie, głuszcze zwyczajne, łyski zwyczajne i cyraneczki zwyczajne mogą być nosicielami *Y. enterocolitica*, a właściwa ocena sytuacji epizootycznej w zakresie zakażeń pałeczkami z rodzaju *Yersinia* wymaga prowadzenia dwóch typów hodowli i molekularnego potwierdzenia prawidłowości izolacji. Szczepy *Y. enterocolitica* izolowane od zwierząt wolno żyjących charakteryzują się obecnością fragmentu genu *ystB*, w większości należą do genotypu G1, bioserotypu 1A/NT i cechują się wielolekoopornością.

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

3 – e-mail: [marta.piecznywek@uwm.edu.pl](mailto:marta.piecznywek@uwm.edu.pl)

## Wpływ niskich dawek zearalenonu podawanego niedojrzałym płciowo loszkom na ich profil metaboliczny i wskaźniki produkcyjne\*

A. Rykaczewska<sup>1</sup>, M. Gajęcka

*Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
UW-M w Olsztynie*

Zearalenon (ZEN) jest mikotoksyną produkowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. W klimacie umiarkowanym jest często stwierdzany jako czynnik zanieczyszczający ziarna zbóż oraz ich przetwory. ZEN oraz jego metabolity, powodują zaburzenia w funkcjonowaniu układu rozrodczego zwierząt i ludzi ze względu na zbliżoną budowę tych związków do estradiolu. Powyższe zaburzenia to wynik oddziaływania wysokich dawek ZEN, a zjawiska te są już w miarę dobrze poznane i opisane. Z kolei wpływ niskich, monotonicznych dawek tej mikotoksyny nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Celem badań było sprawdzenie czy niskie dawki ZEN, podawane niedojrzałym płciowo loszkom, przez okres 45 dni mogły wywoływać zmiany w wybranych wskaźnikach metabolicznych. Do doświadczenia wykorzystano zwierzęta o początkowej masie ciała  $14,5 \pm 2$  kg. Podzielono je losowo na 3 grupy doświadczalne i jedną grupę kontrolną (C). Do każdej z nich wybrano losowo po 15 loszek. Zwierzętom z grupy EI podawano *per os* ZEN w dawce  $5\mu\text{g/kg}$  m.c., zwierzętom z grupy EII podawano *per os* ZEN w dawce  $10\mu\text{g/kg}$  m.c., a w grupie EIII zwierzętom podawano *per os* ZEN w dawce  $15\mu\text{g/kg}$  m.c. Loszkom z grupy C podawano *per os* placebo. Próbkę do wyżej wymienionych analiz pobrano 10 krotnie, w odstępach pięciodniowych. Częstotliwość występowania statystycznie istotnych zmian we wskaźnikach biochemicznych krwi malała podczas trwania eksperymentu. Powyższe zjawisko można przypisać efektowi kompensacyjnemu tj. stymulacji lub hamowaniu analizowanych wskaźników po początkowym okresie ekspozycji. Powyższe zmiany wskaźników biochemicznych były częściej obserwowane w grupie C niż grupach EI, EII i EIII. Było to prawdopodobnie spowodowane wyższymi wydatkami energetycznymi związanymi z biotransformacją ZEN w grupach eksperymentalnych niż w grupie kontrolnej. Wyższe przyrosty masy ciała loszek, które otrzymywały ZEN mogły być również odpowiedzialne za wyżej opisane zjawisko. Niewielkie, ale statystycznie istotne zmiany wskaźników morfologicznych krwi zaobserwowano głównie w trzech pierwszych tygodniach ekspozycji na niskie dawki ZEN. Było to prawdopodobnie wynikiem narażenia na niskie dawki zearalenonu o niskich wartościach współczynnika przeniesienia do jelit i wątroby pod koniec eksperymentu. Odmienny wpływ badanej mikotoksyny na ilość elementów morfotycznych krwi na początku i na końcu doświadczenia był również modyfikowany przez mechanizmy adaptacyjne, które są niezbędne do utrzymywania homeostazy organizmu. Uzyskane wyniki pozwalają wywnioskować, że niskie dawki ZEN indukują odmienne zmiany we wskaźnikach biochemicznych i morfologicznych krwi, niż ekspozycja na wysokie dawki tej mikotoksyny.

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

<sup>1</sup> – e-mail: [anna.rykaczewska@uwm.edu.pl](mailto:anna.rykaczewska@uwm.edu.pl)

## **Zmiany w układzie oddechowym w przebiegu wirusowego zapalenia stawów i mózgu kóz\***

A.Moroz<sup>1</sup>, M. Czopowicz<sup>1</sup>, O. Szaluś-Jordanow<sup>2</sup>, M. Mickiewicz<sup>1</sup>, J.Kaba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Samodzielna Pracownia Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej, SGGW Warszawa,*

<sup>2</sup>*Zakład Chorób Zakaźnych, Katedra Chorób Małych Zwierząt z Kliniką, SGGW Warszawa*

**Wstęp.** Choroby układu oddechowego należą do jednych z najczęstszych problemów zdrowotnych w stadach kóz. Choroby te mają etiologię bakteryjną, wirusową oraz pasożytniczą. Jedną z chorób wirusowych występujących powszechnie u kóz w Polsce jest wirusowe zapalenie stawów i mózgu (ang. caprine arthritis-encephalitis, CAE) wywoływane przez lentiwirus małych przeżuwaczy (ang. small ruminant lentivirus, SRLV). W przebiegu tej choroby rozwijają się między innymi przewlekłe śródmiąższowe zapalenie płuc, które może predysponować do wtórnych zakażeń bakteryjnych.

**Cel.** Celem pracy jest określenie zmian chorobowych rozwijających się w układzie oddechowym w przebiegu zakażenia SRLV.

**Materiały i metody.** Od 1300 kóz przeżyciowo pobierany był materiał do badań laboratoryjnych: krew do badań serologicznych oraz wymazy z nosa do badań mikrobiologicznych. Przeprowadzono sekcje 200 kóz ras polskiej białej uszlachetnionej, polskiej barwnej uszlachetnionej oraz anglonubijskiej u których potwierdzono serologicznie SRLV i które wykazywały objawy CAE. Wykonane były badania radiograficzne klatki piersiowej (RTG i tomografia komputerowa). W trakcie sekcji pobrano fragmenty tkanki płucnej, wymazy z oskrzeli do badania bakteriologicznego. U zwierząt tych wykonano badania serologiczne metodą ELISA w kierunku zakażenia *Corynebacterium pseudotuberculosis* oraz zakażenia wirusem parainfluenzy (PIV), bakteriologiczne i radiograficzne oraz przygotowano materiał do oceny histopatologicznej, wykorzystując różne techniki barwienia: barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E), metodą Massona (w celu wybarwienia tkanki łącznej) oraz metodą Weigerta (w celu wybarwienia włókna).

**Wyniki i wnioski.** W przebiegu wirusowego zapalenia stawu i mózgu kóz dochodzi do śródmiąższowego zapalenia płuc o różnym nasileniu. Przy dołączeniu się wtórnych zakażeń wirusowych lub bakteryjnych obserwujemy nieżytowo-ropne, ropne, ropno-ziarniniakowe zapalenie płuc. W przypadku dużego nasilenia zmian w obrazie histopatologicznym obserwowana jest również rozedma, martwica oraz silne przekrwienie tkanki płucnej.

**Słowa kluczowe:** zapalenie płuc, kozy, wirusowe zapalenie stawów i mózgu kóz.

---

\* Badania finansowane z projektu promotorskiego KNOW nr UMO-KNOW2016/SGGW/PRO1/01/3.

e-mail: [agata\\_moroz@sggw.pl](mailto:agata_moroz@sggw.pl)

# Charakterystyka molekularna szczepów polyomawirusa i cirkowirusa gęsiego izolowanych od gęsi w Polsce – badania wstępne\*

K. Piekarska<sup>1,2</sup>, W. Kozdruń<sup>1</sup>

*Zakład Chorób Drobiu*

*<sup>1</sup>Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Wielkotowarowy chów gęsi związany ze znacznym zagęszczeniem ptaków, stwarza realny wzrost zagrożenia epidemiologicznego zwłaszcza ze strony chorób wirusowych. Coraz częściej obserwuje się zakażenia cirkowirusem gęsim (GoCV) oraz polyomawirusem gęsim (GHPV) wywołującym syndrom krwotocznego zapalenia nerek i jelit u gęsi (HNEG).

Celem badań była identyfikacja materiału genetycznego polyomawirusa gęsiego oraz cirkowirusa gęsiego wyizolowanych z przypadków terenowych oraz ich wstępna charakterystyka molekularna przy użyciu analizy filogenetycznej. W latach 2010-2018 zgromadzono homogenaty narządów pochodzące z 68 stad gęsi. Identyfikację GHPV prowadzono na podstawie wykrycia obecności materiału genetycznego wirusa GHPV, a następnie analizy sekwencji kodującej białko strukturalne VP1 z wykorzystaniem techniki PCR. Sekwencje uzyskanych amplikonów poddano analizie filogenetycznej.

Celem namnożenia, wybrane materiały wirusowe wykorzystywano do zakażenia hodowli fibroblastów zarodków gęsich (GEF), hodowli komórki nerki zarodków gęsich (GEK) oraz zakażenia zarodków gęsich do woreczka żółtkowego (YS) oraz do jamy omocznioowo-owodniowej (CAS). Obecność materiału genetycznego GHPV stwierdzono w 28 przebadanych próbkach co stanowiło 41.17%, natomiast w 20 stadach uzyskano produkty PCR o spodziewanej wielkości 379 pz (fragment białka VP1), w 8 stadach uzyskano produkty PCR o wielkości 1232 pz (całe białko VP1). Analizę sekwencji przeprowadzono dla 18 próbek potwierdzając przynależność do GHPV. Podjęto próbę namnożenia GHPV w hodowli komórek zarodka gęsiego (GEK). Dla wybranych 5 szczepów przeprowadzono siedem pasażi. Charakterystyczny efekt cytopatyczny (CPE) zaobserwowano w 2 przypadkach w trzecim pasażu. Technika PCR potwierdziła obecność materiału genetycznego GHPV.

Zarodki gęsie zakażano do woreczka żółtkowego (YS) i do jamy owodniowo-omocznioowej (CAS). Wykonano 3 pasażi dla każdego szczepu. Użyto 8 szczepów GHPV dla każdej drogi zakażenia. Obserwowano charakterystyczne dla zakażenia GHPV zmiany anatomopatologiczne w postaci: wybroczyn w okolicy szyi zarodka, przekrwienia nerek, zastojów w wątrobie oraz wylewów krwawych na oponach mózgowych. Obecność materiału genetycznego GHPV potwierdzano techniką PCR. Obecność materiału genetycznego GoCV stwierdzono w 37 stadach co stanowiło (54,41%) na podstawie obecności produktu PCR o wielkości 308 pz. Wykorzystując startery dla białka Rep potwierdzono obecność GoCV w 20 próbkach i w 10 próbkach wykorzystując startery o długości 445 pz. Analizę sekwencji przeprowadzono dla 18 próbek potwierdzając przynależność do GoCV w przypadku białka Vpg4, 14 próbek dla białka Rep i 5 próbek dla 445 pz.

\* 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: [karolina.piekarska@piwet.pulawy.pl](mailto:karolina.piekarska@piwet.pulawy.pl)

## **SESJA PLAKATOWA**

## Wpływ różnych pożywek i metod hodowli *in vitro* na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika\*

A. Chołoniewska<sup>1</sup>, J. Chołoniewski<sup>2</sup>, K. Barłowska<sup>1</sup>, E. Szablisty<sup>1</sup>, E. Wenta-Muchalska<sup>1</sup>, J.A. Modliński<sup>1</sup>, A. Piliszek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Jastrzębiec, Polska

<sup>2</sup> Centrum Doskonałości Badań Układów Złożonych, Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska, Warszawa, Polska

Zarodki królika hodowane *in vitro* są w stanie rozwijać się od stadium zygoty do blastocysty w szerokim spektrum pożywek hodowlanych, m.in. w sekwencyjnych lub jednoetapowych pożywkach używanych do hodowli zarodków ludzkich. Umiejętność rozwoju w różnych warunkach hodowlanych wymaga potwierdzenia prawidłowego wzorca rozwoju zarodkowego na podstawie innych parametrów niż tylko morfologii zarodka. Nasze badania pokazują, jak różne pożywki hodowlane i metody hodowli *in vitro* wpływają na kluczowe wydarzenie w przedimplantacyjnym rozwoju ssaczych zarodków tj. na różnicowanie się pierwszych linii komórkowych: pluripotentnego epiblastu (EPI), pierwotnej endodermi (PreE) oraz trofektodermi (TE)

Zarodki królika pozyskane w stadium zygoty (19 hpc) hodowane były w: dwóch typach pożywek sekwencyjnych (a. G-1:PLUS/G-2:PLUS [Vitrolife]; b. G-1/G-2); dwóch typach pożywek jednoetapowych z odnowieniem (a. RDH + 0,3% BSA; b. RDH), gdzie zarodki w trakcie hodowli były przenoszone do świeżej kropli pożywki; oraz w dwóch typach pożywek jednoetapowych (Global [Life Global] a. z dodatkiem 0,3% BSA b. bez dodatku BSA). Następnie, po 120 h hodowli, zarodki były analizowane pod kątem morfologii, liczby komórek oraz za pomocą immunofluorescencji pośredniej, wykrywane były czynniki transkrypcyjne charakterystyczne dla poszczególnych linii komórkowych: CDX2 dla TE, SOX17 dla PrE oraz SOX2 dla EPI.

Nasze wyniki pokazują, że królicze zarodki hodowane w pożywkach sekwencyjnych i jednoetapowych z odnowieniem pożywki, nie tylko częściej osiągały stadium blastocysty niż zarodki hodowane w pożywkach jednoetapowych (82% vs 89% vs 47%), ale również średnio miały większą liczbę komórek ( $105 \pm 4$  vs  $113 \pm 5$  vs  $72 \pm 4$ ) oraz więcej komórek Sox2-pozytywnych ( $8 \pm 2$  vs  $8 \pm 3$  vs  $0,3 \pm 0,2$ ). Średnia liczba komórek Cdx2-pozytywnych była najwyższa w zarodkach hodowanych w pożywkach jednoetapowych z odnowieniem ( $3 \pm 1$  vs  $18 \pm 2$  vs  $0,1 \pm 0,1$ ). Liczba komórek Sox17-pozytywnych wydaje się być niezależna od zastosowanej metody hodowli, jednak ich liczba była wyższa w pożywkach bez dodatku białkowego ( $20 \pm 2$  vs  $5 \pm 1$ ).

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

1 -e-mail: [a.choloniewska@ighz.pl](mailto:a.choloniewska@ighz.pl)

## Rola fibroblastów i adipocytów w regulacji rozwoju nabłonka sutkowego u bydła\*

Ż. Dziegielewska<sup>1,2</sup>, M. Gajewska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Gruczoł mlekowy to jeden z nielicznych narządów u ssaków, który podlega naturalnym cyklom proliferacji, różnicowania oraz apoptozy wielokrotnie podczas życia samicy. Zarówno komórki nabłonkowe jak i mioepitelialne na każdym etapie rozwoju gruczołu pozostają w bezpośrednim lub pośrednim kontakcie z komórkami tworzącymi zrąb gruczołu. Najliczniejszą grupę stanowią adipocyty oraz komórki tkanki łącznej, fibroblasty. Wyniki badań wskazują, że rozwój części wydzielniczej gruczołu jest regulowany nie tylko przez hormony, ale również lokalnie wytwarzane czynniki wzrostu oraz oddziaływania międzykomórkowe. Celem badań było zbadanie wpływu czynników parakrynnych wydzielanych przez adipocyty na różnym etapie różnicowania na rozwój komórek nabłonka gruczołowego u bydła z wykorzystaniem kultur pierwotnych.

Wyizolowane z torebki tłuszczowej nerki krowy mezenchymalne komórki macierzyste - **bASC** (*ang. bovine adipose derived stem cells*) hodowano w pożywce wzrostowej DMEM/F12 z dodatkiem 10% surowicy. Po osiągnięciu konfluencji pożywkę zmieniano na różnicującą, z dodatkiem izobutylometyloksantyny, rozyglitazonu, deksametazonu oraz ITS (insuliny-transferyny-selenu). Zdolność do różnicowania wyizolowanych preadipocytów potwierdzono barwieniem kropel tłuszczu z użyciem czerwieni olejowej O (*ang. Oil Red O*) oraz barwieniem fluorescencyjnym LipodTOX<sup>TM</sup>. Następnie zbierano 4 typy pożywek kondycyjalnych z poszczególnych etapów różnicowania adipocytów (z dnia 0, 8, 12, 14). Wyizolowane pierwotne komórki nabłonka gruczołowego bydła – **bMEC** (*ang. bovine mammary epithelial cells*) hodowano w pożywce wzrostowej DMEM/F12 z dodatkiem 10% surowicy, transferyny, hydrokortyzonu oraz insuliny. Czystość populacji potwierdzono w barwieniu immunofluorescencyjnym z użyciem markerów: MUC-1, cytokeratyny 18, cytokeratyny 19, cytokeratyny 14 oraz  $\alpha$ -SMA. Następnie komórki bMEC traktowano pożywką kondycjonowaną przez 24 godziny. Oceniono następujące parametry: żywotność komórek (test MTT), ich potencjał proliferacyjny (CyQUANT Cell Proliferation Assay) oraz zdolność do migracji na płytkach hemotaksyjnych (BD Falcon<sup>TM</sup> FluoroBlock<sup>TM</sup> 24-Multiwell Insert Plates) z wykorzystaniem barwienia przyżyciowego kalceiną AM. Dodatkowo zbadano obecność wybranych adipokiny w pożywkach kondycjonowanych przy użyciu testów ELISA.

Badania pokazały, że komórki bASC, które po izolacji wykazują morfologię komórek fibroblastycznych, mają zdolność do przeprowadzenia procesu adipogenezy. Otrzymane w hodowli *in vitro* bydlęce adipocyty są zdolne do syntezy biologicznie aktywnych związków, m.in. adiponektyny, leptyny oraz chemeryny. Pożywki kondycjonowane zawierające czynniki parakrynnie wydzielane przez bydlęce adipocyty podwyższały żywotność komórek nabłonka gruczołu mlekowego. Z kolei związki wydzielane do pożywki przez nieodróżnicowane komórki bASC, wykazujące morfologię fibroblastów, istotnie stymulowały komórki bMEC do migracji, co może świadczyć o roli fibroblastów w rozbudowie tkanki wydzielniczej podczas mammogenezy.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr KNOW2015/CB/PRO1/21).

2 – e-mail: [zanetadziegielewska@gmail.com](mailto:zanetadziegielewska@gmail.com)

## Aktywacja układu immunologicznego matki i jej konsekwencje dla rozwoju neurologicznego potomstwa w owczym modelu infekcji prenatalnej\*

W. Florek<sup>1,2</sup>, K. Barłowska<sup>1</sup>, J. A. Modliński<sup>1</sup>, S. Sampino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, Magdalenka*

Infekcja matki w czasie ciąży jest powiązana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa. W ostatnich latach opracowano wiele modeli zwierzęcych aktywacji układu immunologicznego matki (ang. *Maternal Immune Activation*, MIA), bazujących głównie na myszach i szczurach. Koncentrowanie badań dotyczących złożonych zaburzeń ludzkiego mózgu wyłącznie na modelach zwierzęcych opartych na gryzoniach ma jednak wiele ograniczeń. Dlatego, celem prezentowanych badań było stworzenie nowego modelu translacyjnego MIA indukowanego poprzez podawanie ciężarnym owcom endotoksyny bakteryjnej – lipopolisacharydu (LPS).

Ciężarnym maciorkom podawano iniekcje z LPS (MIA, 1,2mg/kg bw.) lub solą fizjologiczną (CTR) w różnych punktach czasowych rozwoju prenatalnego – 85 dpc, odpowiadające drugiemu trymestrowi, oraz 125 dpc, odpowiadające trzeciemu trymestrowi ciąży u ludzi ( $n$ : CTR<sub>85</sub>=11, MIA<sub>85</sub>=12, CTR<sub>125</sub>=13, MIA<sub>125</sub>=12). Jagnięta były następnie poddawane baterii testów behawioralnych: test ominięcia przeszkody w kształcie litery V (40 dzień życia) i test labiryntu w kształcie litery T. Testy miały na celu zbadanie uczenia przestrzennego jagniąt, ich pamięci i elastyczności poznawczej w warunkach paradygmatu motywacji społecznej. Nagrania uzyskane z przeprowadzanych testów były analizowane z wykorzystaniem programu do śledzenia video Noldus EthoVision XT 11.5.

Jagnięta MIA<sub>125</sub> wykazały istotnie wyższy czas potrzebny na ukończenie testu ominięcia przeszkody w kształcie litery V w drugim dniu treningu utrwalenia nawyku w porównaniu do grupy CTR<sub>125</sub> ( $P<0.01$ ). U jagniąt płci męskiej z grupy MIA<sub>85</sub> iniekcja LPS wpłynęła negatywnie na zdolność ukończenia prób polegających na odwrotnym uczeniu się w drugim dniu testu ominięcia przeszkody w kształcie litery V, jednakże uzyskane różnice nie były istotne statystycznie (Chi square test,  $p=0.0719$ ). Ponadto, podczas gdy jagnięta z grupy CTR<sub>85</sub> wykazały istotną poprawę w czasie potrzebnym na ukończenie testu ( $p<0.001$ , 1-way ANOVA), jagnięta z grupy MIA<sub>85</sub> nie poprawiły swoich wyników ( $p>0.05$ ). Iniekcja z LPS w różnych punktach czasowych rozwoju prenatalnego nie wpłynęła na występowanie zachowań perseweratywnych u potomstwa.

Uzyskane wyniki wskazują, że iniekcja LPS w późnej ciąży może wpłynąć na zdolność uczenia się i pamięć u potomstwa, natomiast na wcześniejszym etapie rozwoju – na ich zdolność uczenia się i elastyczność poznawczą. Pojedyncza iniekcja LPS w różnych punktach czasowych rozwoju prenatalnego nie wpływa na występowanie zachowań perseweratywnych. Dalsze badania powinny uwzględnić wielokrotne podawanie LPS w celu lepszego modelowania przebiegu infekcji prenatalnej u człowieka.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr KNOW2015/CB/PRO1/47)

2 - e-mail: [w.florek@ighz.pl](mailto:w.florek@ighz.pl)

# Wpływ transferu limfocytów CD4<sup>+</sup> na odpowiedź immunologiczną myszy żywionych homogenatem mięsa z kurczaka\*

E. Fuc, Złotkowska D., Wróblewska B.

*Zakład Immunologii i Mikrobiologii Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

Pacjenci z nadwrażliwością na białko jaja kurzego mogą zmagać się reakcjami alergicznymi po spożyciu białek mięsa z kurczaka wskutek występowania reakcji krzyżowych. Dlatego konieczne jest badanie mechanizmów immunologicznych w celu zaproponowania alternatywnych rozwiązań dla osób zmagających się z nadwrażliwością pokarmową.

Celem pracy była ocena wpływu adoptywanego transferu indukowanych owoalbuminą limfocytów CD4 na odpowiedź immunologiczną biorcy żywionego homogenatem mięsa z kurczaka w kontekście reakcji krzyżowych pomiędzy białkami jaj, a białkami mięsa z kurczaka.

Eksperyment przeprowadzono wykorzystując model immunizowanych myszy Balb/c. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: Dawcy, Biorcy i Kontrolna. Grupa Dawców była trzykrotnie immunizowana OVA (100 µg) z adjuwantem Freund'a. Po terminacji z tkanek śledziony i węzłów chłonnych głowy i szyi wyizolowano limfocyty T CD4. Oczyszczone komórki (96%) zostały przetransferowane do naiwnych myszy - Biorcy. Kolejno zwierzętom podawano przez okres 14 dni homogenat mięsa z kurczaka w ilości 3mg/mysz. Grupę Kontrolną stanowiły zwierzęta immunizowane OVA oraz karmione homogenatem mięsa z kurczaka. Po zakończeniu doświadczenia scharakteryzowano odpowiedź komórkową: udział poszczególnych subpopulacji limfocytów T w węzłach chłonnych oraz hodowli splenocytów, poziom cytokin wydzielanych do medium hodowlanego, stopień proliferacji limfocytów (PI) (cytometria przepływowa) oraz odpowiedź humoralną (poziom specyficznych przeciwciał IgA, IgG oraz całkowitego IgE oznaczono metodą ELISA).

Wyniki wykazały, że transfer limfocytów CD4<sup>+</sup> istotnie wpłynął na odpowiedź humoralną oraz komórkową Biorców. Zaobserwowano, że grupę Biorców posiadała statystycznie niższy poziom specyficznych anty-OVA IgG ( $p < 0.001$ ) oraz niższa sekrecja specyficznych IgA w porównaniu z Kontrolną. Podobną tendencję obserwowano w poziomie całkowitego IgE. Ponadto stymulacja *in vitro* owoalbuminą splenocytów grupy Kontrolnej skutkowała wyższym indeksem proliferacyjnym w porównaniu do grupy Biorców. Zaobserwowano również różnice w profilach wydzielanych cytokin. Komórki Biorców po stymulacji owoalbuminą wydzielaly większe ilości IL-10. Ponadto splenocyty Biorców charakteryzowały się wyższym poziomem sekrecji IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ) oraz nie wydziały IL-4. Różnice widoczne były również w profilu limfocytów T.

Uzyskane wyniki wskazują, że transfer indukowanych OVA komórek CD4<sup>+</sup> znacząco wpłynął na odpowiedź immunologiczną gospodarza. Identyfikacja towarzyszących mechanizmów może być pomocna w opracowaniu nowych strategii interwencji terapeutycznej w alergii pokarmowej.

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

## Wpływ prokinetycyny 1 na proces angiogenezy we wczesnej ciąży w endometrium świni\*

E. Goryszewska<sup>1,2</sup>, M. Baryła<sup>1</sup>, P. Kaczyński<sup>1</sup>, A. Waclawik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

Prokinetycyna 1 (PROK1) nazywana również naczyniowym śródbłonkowym czynnikiem wzrostu pochodzącym z gruczołów dokrewnych (EG-VEGF) jest hormonem działającym plejotropowo. Badania przeprowadzone głównie u kobiety wykazały kluczową rolę PROK1 w regulacji licznych procesów związanych z ciążą, takich jak: angiogeneza, proliferacja, regulacja odpowiedzi immunologicznej. W endometrium kobiet ekspresja *PROK1* i jej receptora (*PROKR1*) jest podwyższona w okresie implantacji oraz podczas rozwoju łożyska w pierwszym trymestrze ciąży. W dostępnym piśmiennictwie brakuje informacji na temat roli PROK1 podczas wczesnej ciąży u zwierząt gospodarskich, w tym także u świni. Celem badań było określenie wpływu PROK1 na proliferację komórek endotelialnych oraz formowanie się struktur kapilaropodobnych (angiogeneza) w endometrium macicy świni podczas wczesnej ciąży.

Dojrzałe płciowo loszki po dwóch, naturalnych cyklach rujowych, poddano kryciu. Następnie, zwierzęta zostały poddane ubojowi w dniach 15-16 (n=10) oraz 19-20 (n=5) ciąży. W celu izolacji komórek endotelialnych ze środkowej części rogów macicy pobierano fragmenty endometrium, które trawiono dyspazą II, a następnie kolagenazą I. Mieszaninę komórek poddano selekcji za pomocą kulek magnetycznych (Dynabeads® CD31 Endothelial Cell) zgodnie z procedurą producenta. Uzyskaną czystą populację komórek endotelialnych hodowano do osiągnięcia minimum 80% konfluencji. W celu określenia wpływu PROK1 na proliferację, komórki endotelialne po pasażu posiano na płytkę 96 dołkową i hodowano do osiągnięcia odpowiedniej konfluencji (ok. 40%). Następnie, komórki poddano 24 h inkubacji z PROK1 w obecności lub braku następujących czynników: antagonisty receptora PROK1 (PC7), inhibitora kinazy MEK (PD098059), inhibitora kinazy IP3K (LY294002), inhibitora kinazy AKT1/2, inhibitora szlaku mTOR (rapamycyna), inhibitora szlaku NFκB (Bay11-7082) oraz inhibitora syntazy cAMP (SQ22536). Poziom proliferacji badano z wykorzystaniem zestawu CellTiter 96®Aqueous One Solution. Natomiast, w celu określenia wpływu PROK1 na formowanie się struktur kapilaropodobnych, komórki endotelialne endometrium świni z dni 15-16 (n=6) i 19-20 (n=4) posiano na szalki dedykowane do badania angiogenezy i inkubowano 6 h z PROK1 w obecności lub braku PC7. Tworzenie się połączeń między komórkami obserwowano przyżyciowo wykorzystując mikroskop Zeiss Axio Observer System z oprogramowaniem ZEN Blue 2.3 pro. Uzyskane wyniki poddano analizie one-way ANOVA, wykorzystując test Tukey'a (GraphPad Prism 8.1.2).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że PROK1 zwiększyła proliferację komórek endotelialnych endometrium zarówno w 15–16, jak również w 19–20 dniu ciąży (p<0,05). Efekt ten znoszony był po zastosowaniu antagonisty receptora PROK1 oraz badanych inhibitorów. Wykazano również sytylujący wpływ PROK1 na formowanie się struktur kapilaropodobnych przez komórki endotelialne w obu badanych dniach ciąży. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost w 15 z 20 badanych parametrów opisujących proces angiogenezy (p<0,05), który został zniesiony po zastosowaniu PC7. Uzyskane wyniki wskazują, że PROK1 stymuluje proliferację komórek endotelialnych endometrium przy udziale następujących szlaków: kinazy MEK, kinazy IP3K, kinazy AKT1/2, szlaku mTOR, szlaku NFκB oraz syntazy cAMP. Podsumowując, PROK1 jest ważnym czynnikiem regulującym proces angiogenezy w endometrium we wczesnej ciąży u świni.

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

2 – e-mail: [e.goryszewska@pan.olsztyn.pl](mailto:e.goryszewska@pan.olsztyn.pl)

# **Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako aktywne mediatory komunikacji pomiędzy zarodkiem a matką podczas wczesnej ciąży u świni domowej\***

M.M. Guzewska<sup>1,3</sup>, Y. Heifetz<sup>2</sup>, M.M. Kaczmarek<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland*

<sup>2</sup>*The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel*

Proces uzyskania przez macicę stanu receptywności jest niezbędny do ustalenia prawidłowej, zsynchronizowanej w czasie komunikacji między zarodkiem a matką, która ostatecznie warunkuje utrzymanie i prawidłowy przebieg ciąży. Sugeruje się, że istotną rolę w tej komunikacji odgrywają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*; EV), które transportują do innych komórek mRNA, miRNA oraz białka. W niniejszych badaniach postawiono hipotezę badawczą, że elementy szlaku biosyntezy i uwalniania oraz horyzontalnego transferu EV podlegają wpływom sygnałów zarodkowych, modulując interakcje zachodzące między zarodkiem a błoną śluzową macicy we wczesnej ciąży u świni.

Aby zweryfikować hipotezę w pierwszym etapie scharakteryzowano populację EV posługując się transmisyjną mikroskopią elektronową, którą wykonano na skrawkach uzyskanych z tkanek pochodzenia zarodkowego oraz *endometrialnego* w 12, 14, 16, 18 oraz 20 dniu ciąży [DP] (n=2-4/dzień). Obserwowano liczne EV, otoczone podwójną błoną komórkową oraz ciała wielopęcherzykowe zlokalizowane w obrębie komórek nabłonkowych *endometrium* i trofektodermi. Zaobserwowano autokrynni (charakterystyczny głównie dla komórek trofoblastu) oraz merokrynni (charakterystyczny dla obu badanych tkanek) sposób uwalniania EV do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a także zależną od klatryny endocytozę pęcherzyków. Potwierdzono komórkową lokalizację białek istotnych w procesach biosyntezy i dystrybucji EV przy użyciu barwienia immunofluorescencyjnego preparatów *endometrium* wraz z przylegającym do niego trofoblastem w 12, 16 i 19DP. Określono specyficzną tkankowo/komórkowo lokalizację białek zaangażowanych w różne szlaki transportu (np. Rab27A), biogenezy (np. Vps37B, Alix) lub będące markerami EV (tetraspanina CD63). Następnie postanowiono zbadać profil ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w procesy biosyntezy i dystrybucji EV. W tym celu wybrano geny kodujące białka kompleksu ESCRT (ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) oraz białka grupy RAB. Wykorzystano materiał pochodzący od loszek ciężarnych lub będących w cyklu rujowym: *endometrium* (dni 11-12, 15-16, 17-19, n=5-9/dzień/status) oraz zarodki/trofoblasty (dni 11-12, 15-16, 17-19, n=5-9/dzień). Przy użyciu techniki real-time PCR udało się uchwycić różnice w ekspresji w badanych genów w przebiegu cyklu rujowego oraz ciąży, a także pomiędzy cyklem a ciążą. Oceniono również wpływ sygnałów zarodkowych na ekspresję badanych genów.

Na podstawie przeprowadzonych badań, potwierdzono dwoma niezależnymi technikami obecność EVs i ich biomarkerów w komórkach *endometrium*, zarodkach i trofoblastach świni. Dodatkowo wyznaczono charakterystyczne profile ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w procesy biosyntezy i dystrybucji EV, sugerujące która z badanych struktur (*endometrium*/trofoblast) jest odpowiedzialna za sekrecję EV w kolejnych dniach ciąży, a która nastawiona jest na odbieranie informacji niesionej przez EV. Obserwowano również prawdopodobny wpływ działających lokalnie sygnałów zarodkowych na biosyntezę i dystrybucję EV. Uzyskane wyniki pozwoliły na rozszerzenie hipotezy badawczej, która zostanie przetestowana w nowym projekcie badawczym zatytułowany: *Rola mikroRNA oraz prostaglandyn w regulacji biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórkach trofoblastu świni: badania in vitro* (PRELUDIUM/2018/29/N/NZ9/02331).

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr KNOW2015/CB/PRO1/27).

3 – e-mail: [m.guzewska@pan.olsztyn.pl](mailto:m.guzewska@pan.olsztyn.pl), [m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl](mailto:m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl)

# Molekularny mechanizm mioprotekcyjnego oddziaływania geranylgeraniolu w modelu komórkowym miopatii zależnej od statyn\*

A. Jaśkiewicz<sup>1</sup>, B. Pająk<sup>2</sup>, A. Orzechowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa; <sup>2</sup> Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa

Statyny, inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, są powszechnie stosowane w zwalczaniu hypercholesterolemii, a negatywne skutki ich oddziaływania obejmują przede wszystkim niekorzystny wpływ na mięśnie szkieletowe. Pomimo licznych badań, mechanizm miotoksycznego oddziaływania statyn wciąż pozostaje niejasny. Badania własne dotyczące skutków ubocznych hamowania przez statyny przemian kwasu miewalonowego w komórkach mięśniowych wykazały, że wśród niesterolowych izoprenoidów wyłącznie geranylgeraniol (GGOH) jest w stanie przywrócić upośledzoną przez statyny żywotność komórek mięśniowych. Głównym celem przedstawionego projektu było zidentyfikowanie molekularnego mechanizmu miotoksyczności statyn oraz wyjaśnienie podłoża cytoprotekcyjnych właściwości GGOH.

W badaniach zastosowano atorwastatynę (ATR) i simwastatynę (SIM), jako odpowiednio przykład statyny mniej (ATR) i bardziej lipofilnej (SIM). Do badań wykorzystano komórki mięśniowe mysiej linii C2C12, u których w warunkach hodowli komórkowej wywołano różnicowanie zmieniając pożywkę z wzrostowej na różnicującą. Proces różnicowania trwał 5 dni, przy czym materiał do badań pozyskiwano w dniach: 1. (proliferujące mioblasty), 3. (różnicujące się miotuby), 5. (zróżnicowane miotuby).

Autofagia jako podstawowy proces degradacji wewnątrzkomórkowej, odpowiada za utrzymanie homeostazy w czasie wzrostu i różnicowania mięśni szkieletowych. Z tego względu w pierwszym etapie badań nad mechanizmem ochronnego wpływu GGOH, gwarantującym przeżycie komórek mięśniowych poddanych działaniu statyn, przeprowadzono serię doświadczeń „autophagy flux”, wykorzystujących chlorochinę (CQ) jako czynnik lizosomotropowy hamujący autofagię na etapie degradacji. Zwiększona akumulacja białka MAPLC3-IIb obserwowana była w 1. i 3. dniu różnicowania komórek C2C12, niezależnie od oddziaływania statyn, a zastosowanie CQ nie wpłynęło na cytoprotekcyjne właściwości GGOH w komórkach poddanych działaniu ATR lub SIM. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż działanie ochronne GGOH nie jest zależne od autofagii.

Kolejny etap poszukiwań podłoża cytoprotekcyjnych właściwości GGOH obejmował badania procesu apoptozy. Uzyskane dane świadczą, iż zastosowanie inhibitora pankaspazowego Z-VAD-FMK, hamującego przebieg kaspazo-zależnej apoptozy przyczyniło się wyłącznie do częściowego odwrócenia cytotoksycznego działania ATR i SIM i to jedynie w przypadku wczesnych i dojrzałych miotub (3. i 5. dzień różnicowania). Efekt ten nie był obserwowany w przypadku proliferujących mioblastów (1. dzień różnicowania). Z kolei ALLM – inhibitor  $\mu$ - i m-kalpain, zaangażowany w szlak apoptozy niezależnej od kaspaz, charakteryzował się analogicznym działaniem do GGOH, chroniąc miocyty C2C12 przed negatywnym efektem statyn zarówno na poziomie mioblastów jak i miotub. Ekspresja aktywnej kaspazy 3 zmniejszała się wraz ze stopniem różnicowania miocytów - najsilniejsza ekspresja występowała w proliferujących mioblastach. Z kolei, najwyższe natężenie autofagii w teście „autophagy flux”, ocenione na podstawie poziomu białka MAPLC3-IIb było obserwowane w mioblastach oraz wczesnych miotubach.

W oparciu o zebrane wyniki stwierdzono zależność pomiędzy autofagią i apoptozą, jako procesów wzajemnie uzupełniających się w czasie różnicowania komórek mięśniowych. Ponadto przedstawione dane sugerują, iż ochronne właściwości GGOH wynikają przede wszystkim z zahamowania aktywności kalpaina a nie kaspaz.

Słowa kluczowe: statyny, miopatia zależna od statyn, geranylgeraniol, autofagia, apoptoza

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

## The molecular mechanisms of interaction between copper and iron metabolism\*

A. Jończy<sup>1</sup>, R.R. Starzyński<sup>1</sup>, R. Mazgaj<sup>1</sup>, M. Szudzik<sup>1</sup>, E. Smuda<sup>1</sup>, M. Kamyczek<sup>2</sup>, P. Lipiński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Genetyki I Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu*

<sup>2</sup>*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Doświadczalny Pawłowice*

Niedobór żelaza jest najczęstszą przyczyną anemii, a problem ten dotyczy nie tylko ludzi, ale także innych gatunków ssaków, zwłaszcza prosiąt, które pozbawione suplementacji rozwijają typową anemię mikrocytarną, służąc, jako model do badań nad IDA (ang. *Iron Deficiency Anemia*). Eksport żelaza z enterocytów do krwioobiegu odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tego pierwiastka. W transport ten zaangażowanych jest szereg białek, w tym ferroportyna (Fpn, jedyny znany eksporter żelaza komórkowego) i hefajstyna (Heph, ferrokсыdaza miedziowa). U prosiąt pomimo poważnej niedokrwistości (Hgb  $4,11 \pm 0,97$  g / dl) i niskiej zawartości żelaza w wątrobie, ekspresja transporterów Dmt1 i Fpn oraz reduktazy Cybrd1 w dwunastnicy nie różni się między zwierzętami z niedokrwistością i zwierzętami suplementowanymi dekstranem żelaza. Co więcej, poziom mRNA HIF-2 $\alpha$  (regulator transkrypcji genów odpowiedzialnych za wchłanianie żelaza) w dwunastnicy zwierząt anemicznych jest znacznie niższy w porównaniu do grupy suplementowanej żelazem. Zastosowanie metody immunolokalizacji wykazało obniżony poziom białka HIF-2 $\alpha$  na skrawkach dwunastnicy anemicznych prosiąt. Co ciekawe, zwiększony poziom białka L-ferrytyny w ekstraktach dwunastnicy sugeruje zwiększoną retencję żelaza w dwunastnicy prosiąt z niedokrwistością, jednak sam poziom białka Fpn w ekstraktach błonowych dwunastnicy pozostaje znacznie niższy w grupie prosiąt anemicznych. Ponadto zaobserwowano spadek poziomu mRNA i białka hefajstyny w dwunastnicy anemicznych prosiąt. Hefajstyna jest ferrokсыdazą zależną od Cu, ale zawartość miedzi w dwunastnicy nie różniła się między grupą anemiczną i kontrolną, co potwierdzono poprzez pomiar poziomu białka CCS oraz pomiar aktywności miedziozależnego enymu SOD1. Podobnie poziom mRNA hepcydyny w wątrobie nie różnił się znacząco. Podsumowując, u prosiąt z niedokrwistością pomimo wysokiego zapotrzebowania na żelazo niezbędnego do procesu erytropoezy, lokalna regulacja mechanizmów na poziomie enterocytu w tym obniżony poziom hefajstyny mogą zakłócić proces eksportu żelaza przez Fpn, co prowadzi do retencji żelaza w enterocytach, zmniejszając tym samym jego dostępność dla całego ustroju.

---

\* Badania finansowane z grantu nr KNOW2015/CB/PRO1/46 Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

## Różnicowanie molekularne szczepów *Listeria monocytogenes* pochodzących z produktów mięsnych i środowiska produkcji z użyciem PFGE i MLST\*

M. Kurpas<sup>1,2</sup>, K. Wieczorek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Przeprowadzone badania miały na celu określenie podobieństwa izolatów *Listeria monocytogenes* pochodzących z produktów mięsnych i środowiska ich produkcji.

W doświadczeniu przebadano 150 izolatów *L. monocytogenes*, należących do zbiorów Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Badane szczepy podzielono ze względu na źródło ich izolacji na trzy grupy zawierające po 50 izolatów: produkty surowe (metki, kiełbasy surowe), wędliny (mięsne produkty poddane obróbce termicznej) oraz wymazy (próbki pobrane z różnych powierzchni środowiska produkcji żywności).

Zróżnicowanie izolatów przeprowadzono z użyciem metody PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), opartej na porównywaniu profili makrorestrykcyjnych uzyskanych poprzez trawienie genomów *L. monocytogenes* enzymami *AscI* i *ApaI*. Analizę profili wykonano w programie Bionumerics, a następnie skonstruowano dendrogram i przyporządkowano badane izolaty do grup klonalnych. W doświadczeniu wykorzystano również technikę MLST (Multilocus Sequence Typing) opartą na porównaniu sekwencji genów metabolizmu podstawowego: *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*.

Analiza profili makrorestrykcyjnych uzyskanych metodą PFGE pozwoliła na przyporządkowanie izolatów do 30 grup klonalnych (podobieństwo 90%). Ponadto zaobserwowano 28 grup w obrębie których izolaty wykazywały podobieństwo wynoszące 100%. W metodzie MLST badane *L. monocytogenes* przyporządkowano do 25 różnych typów sekwencyjnych (ST). Najliczniej występowały ST9 (31 izolatów), ST121 (20 izolatów) oraz ST8 (12 izolatów). W grupie izolatów pochodzących z produktów surowych wykryto 15 różnych typów sekwencyjnych w tym najczęściej stwierdzano ST9 (10 izolatów) i ST121 (9 izolatów). W przypadku *L. monocytogenes* z wędlin odnotowano 16 różnych ST w tym po 7 izolatów z ST2, ST9 i ST121. Wśród szczepów wyizolowanych ze środowiska produkcji wykryto 14 typów sekwencyjnych z czego najliczniej występowały ST9 (12 izolatów) i ST5 (8 izolatów).

Uzyskane wyniki pozwoliły na wykazanie różnic w występowaniu *L. monocytogenes* w mięsnych produktach surowych, wędlinach poddanych obróbce termicznej i środowisku produkcji.

\* 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: [monika.kurpas@poczta.piwet.pl](mailto:monika.kurpas@poczta.piwet.pl)

# **Plastyczność neuronów zwoju miednicznego przedniego zaopatrujących trójkąt pęcherza moczowego knura\***

Ż. Listowska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

Zwój miedniczny przedni- APG jest głównym zwojem spłotu miednicznego knura, który odpowiada za autonomiczne unerwienie jego narządów moczopłciowych, w tym trójkąta pęcherza moczowego (TPM) uznanego za lokalne centrum sterowania mikcją. W chwili obecnej brakuje danych na temat zmian zachodzących w neuronach miednicznych pod wpływem przecięcia ich włókien nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy (PM) i narządy płciowe, podczas gdy dokładnie znane są kliniczne konsekwencje takiego urazu.

Celem badania było określenie wpływu jednostronnej aksotomii włókien nerwowych projektujących z prawego APG do TPM na: zmianę liczby i wzorów kodowania chemicznego neuronów i wewnątrzwojowych włókien nerwowych zlokalizowanych w obydwu zwojach APG, jak również na zmiany zachodzące na poziomie ekspresji genów kodujących syntezę badanych substancji biologicznie aktywnych.

Doświadczenie przeprowadzono na 20 niedojrzałych płciowo knurkach rasy Wielka Biała Polska, o masie ciała ok. 10-15 kg m.c. Zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy doświadczalne: grupę M (badania morfologiczne; n=10) i grupę BM (badania molekularne; n=10). Neurony APG zaopatrujące TPM zostały wyznakowane przy użyciu metody wstecznego znakowania komórek nerwowych. Fluorescencyjny znacznik Fast Blue został zaaplikowany do ściany TPM u knurków z podgrupy kontrolnej i eksperymentalnej (3 tygodnie przed aksotomią) przeznaczonych do badań morfologicznych. W celu ujawnienia głównych populacji neuronów zwoju miednicznego przedniego zaopatrujących TPM zastosowano podwójne barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko markerom adrenergicznym (TH i DβH) i cholinergicznym (ChAT i VAcHT). Barwienia immunohistochemiczne dotyczyły również obecności neuropeptydów GAL, VIP, NPY oraz enzymu bNOS w neuronach APG. Badania genetyczne zostały przeprowadzone za pomocą techniki RT- qPCR. Umożliwiła ona ilościową analizę ekspresji genów kodujących badane substancje biologicznie aktywne w tkankach kontrolnych i eksperymentalnych.

Badania wykazały, że pod wpływem jednostronnej aksotomii w prawym, jak i lewym APG doszło do ponad 50% spadku liczby neuronów FB+. Istotne zmiany w kodowaniu chemicznym komórek FB+ odnotowano tylko w prawym zwoju i obejmowały one zmiany w ekspresji DβH/TH (spadek o ok. 30%), VAcHT/ChAT (wzrost o ok. 9%), GAL i VIP (wzrost o ponad 30%). Co więcej, ok. 18% FB+ neuronów prawego APG było immunoreaktywnych wobec bNOS, gdzie ekspresja tej substancji nie była obserwowana w grupie kontrolnej. Ponadto po zabiegu jednostronnej aksotomii w obydwu zwojach APG stwierdzono istotny wzrost ilości włókien DβH/TH- IR, GAL- IR i VIP- IR, znaczny spadek włókien VAcHT- IR oraz zmiany w ekspresji genów kodujących syntezę większości z badanych substancji.

Uzyskane wyniki wskazują, że jednostronna aksotomia włókien spłotu miednicznego jest czynnikiem mogącym indukować zmiany neuroplastyczne w zwoju bezpośrednio odnerwionym, jak i w położonym po stronie przeciwnej do uszkodzenia włókien nerwowych. Zaobserwowany wzrost ekspresji GAL, VIP i bNOS w obydwu APG sugeruje udział tych substancji w procesach związanych z regeneracją i zwiększeniem możliwości przeżycia neuronów miednicznych.

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

2 – e-mail: [zaneta.listowska@uwm.edu.pl](mailto:zaneta.listowska@uwm.edu.pl)

# Interakcje doksycykliny z jonami metali i paszą na etapie wchłaniania z przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów\*

H. Madej-Śmiechowska<sup>1,2</sup>, H. Ziółkowski<sup>1</sup>, J.J. Jaroszewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

**Wstęp:** Doksycyklina (DOX) jest półsyntetycznym, bakteriostatycznym chemioterapeutykem z rodziny tetracyklin o szerokim spektrum działania wobec bakterii Gram (+) i Gram (–) tlenowych i beztlenowych, patogenów atypowych (*Mycoplasma* spp., *Spirocheates* spp., *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., *Ureaplasma* spp.) oraz niektórych pierwotniaków (*Anaplasma* spp., *Toxoplasma* spp., *Plasmodium* spp., *Babesia* spp.). Jest powszechnie stosowana w terapii schorzeń układu oddechowego, moczowego, płciowego, pokarmowego oraz zakażeń skóry.

**Cele:** Opracowanie oraz walidacja prostej, czulej, szybkiej, wiarygodnej i relatywnie taniej metody oznaczania DOX w osoczu kurcząt brojlerów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC–MS/MS). Określenie parametrów farmakokinetycznych (PK) standardu analitycznego DOX u kurcząt brojlerów po jednokrotnym podaniu *per os*, domięśniowym i dożylnym, określenie PK DOX podanej *per os* i dożylnie w dostępnych preparatach komercyjnych oraz określenie wpływu jonów wapnia, magnezu i żelaza i/lub pokarmu na PK DOX po jednorazowym oraz wielokrotnym (odtworządzającym warunki fermowe) podaniu *per os*.

**Materiał i metody:** W doświadczeniu wzięło udział 96 klinicznie zdrowych kurcząt brojlerów w wieku 3 tygodni, podzielonych na 12 grup, po 8 ptaków w każdej oraz 6 ptaków, od których pozyskano materiał do przygotowania krzywych kalibracyjnych. Ptakom w poszczególnych grupach podawano DOX (10 mg/kg m.c.) i/lub jony oraz paszę według ściśle określonego schematu. Celem wyznaczenia zależności stężenie-czas od każdego ptaka pobierano krew w objętości 0,5–1,0 ml w określonych punktach czasowych. Pobraną krew odwirowywano (1600 × g przez 10 min w temp. 4°C), a uzyskane osocze zamrożono w temp. –82°C do czasu analizy chromatograficznej. Analiza HPLC–MS/MS została przeprowadzona przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego WATERS Alliance 2695 sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Waters Quattro micro® API MS (Waters, Milford, MA, USA). Parametry PK wyliczono przy użyciu programu ThothPro™ (Gdańsk, Polska). Dla podania dożylnego zastosowano model 2-kompartimentowy, a dla pozanaczyniowych dróg podania model 1-kompartimentowy. Parametry PK wyliczono dla każdego ptaka i przedstawiono w postaci średniej dla całej grupy. W analizie statystycznej wykorzystano program GraphPad Prism wersja 2.0 (San Diego, CA, USA). W porównaniu wartości średnich poszczególnych grup wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem wielokrotnego porównania Tukeya oraz w wybranych porównaniach dwóch grup test t-studenta.

**Wyniki:** Nowo opracowana metoda pomyślnie przeszła proces walidacji i została wdrożona do oznaczenia stężeń DOX w pobranych próbkach. Uzyskane wyniki badań wskazują, że: a) zarówno w przypadku jednokrotnego jak i wielokrotnego podawania DOX kurczętom brojlerom (niezależnie od drogi oraz warunków podania) osiągała ona stężenia terapeutyczne wobec patogenów odpowiedzialnych za choroby drobiu, b) obecność substancji pomocniczych w preparatach dostępnych na rynku może wpływać na PK DOX, c) pokarm istotnie hamuje wchłanianie DOX, d) obecne w wodzie jony wapnia, żelaza i magnezu nie wpływają istotnie na wchłanianie DOX, d) DOX podawana w warunkach imitujących stosowanie w fermach drobiu zachowuje się odmiennie, niż w przypadku jednokrotnych podań eksperymentalnych, zatem w planowaniu badań PK dla tego leku należy precyzyjnie określić ich cel, by możliwe było zoptymalizowanie warunków doświadczenia.

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

2 - e-mail: [h.madej-smiechowska@uwm.edu.pl](mailto:h.madej-smiechowska@uwm.edu.pl)

## Rozwój unerwienia rynienki przełykowej u bydła domowego (*Bos taurus*)\*

M.Marszałek<sup>1,2</sup>, W.Sienkiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

**Wstęp.** Rynienka przełykowa jest specyficzną częścią przedżołądka zbudowaną z warg oraz dna. Pod wpływem odruchu ssania wargi kurczą się, tworząc swoisty kanał, dzięki któremu płynna treść omija przedżołądki i trafia bezpośrednio do trawieńca. Odruch zamykania rynienki przełykowej jest najsilniej wyrażony u cieląt do 3 miesiąca życia, po tym czasie jej właściwości reflektoryczne słabną, natomiast po ukończeniu 2 roku życia odruch zamykania nie bierze udziału w normalnym procesie pobierania pokarmu.

**Cel.** Celem prowadzonych badań jest poznanie rozwoju unerwienia rynienki żołądka bydła domowego oraz ustalenie: jak zmienia się liczba neuronów i włókien nerwowych obecnych w badanym narządzie oraz jak zmienia się kodowanie chemiczne neuronów śródściennych badanego narządu.

**Materiał i Metody.** Badania przeprowadzono na zwierzętach z sześciu grup wiekowych (n=5): I, II, III trymestr ciąży, 6-cio tygodniowe cielęta, 2 letnie krowy oraz 4 letnie krowy. Rynienki przełykowe pobrano od zwierząt w rzeźni, a następnie utrwalono immersyjnie w 4% zbufozowanym roztworze paraformaldehydu, po 24h przepłukano w buforze fosforanowym i zanurzono w 18% roztworze sacharozy. Tkanki skrojono na skrawki grubości 16µm oraz barwiono z użyciem przeciwciał pierwotnych skierowanych przeciwko VAcHT, NOS.

**Wyniki.** W niniejszych badaniach komórki VAcHT-IR w grupie I stanowiły  $36 \pm 2,03\%$  wszystkich komórek zwojowych. W II trymestrze stanowiły one  $44,33 \pm 2,99\%$ , a w III  $36,33 \pm 1,85\%$ . U cieląt populacja ta stanowiła  $29,07 \pm 1,44\%$ . U zwierząt dorosłych procentowy udział cholinergicznym perikarionów utrzymywał się na zbliżonym poziomie, osiągając  $25,56 \pm 2,31\%$  w grupie V i  $24,89 \pm 2,98\%$  w grupie VI. Podwójne barwienia VAcHT/NOS wykazały, że w populacji neuronów cholinergicznym zwierząt I grupy niemal 39% komórek zawierało jednocześnie immunoreaktywność dla NOS, w przypadku zwierząt grupy II odsetek ten wzrósł do niemal 64% i 71% w przypadku płodów grupy III. U zwierząt 6-tygodniowych stwierdzono drastyczny spadek liczby podwójnie wybarwionych neuronów do około 19%, a u zwierząt grupy V i VI odsetek ten wynosił ponad 40% (46%, 42%).

**Wnioski.** Znaczący spadek odsetka neuronów nitregicznych w populacji neuronów cholinergicznym może mieć bardzo znaczący wpływ na reflektorykę mięśniówki gładkiej rynienki przełykowej. Największa redukcja komponenty hamującej zaobserwowana u 6-tygodniowych zwierząt wskazuje na zwiększoną aktywność skurczową badanego narządu.

\* Badania finansowane z Grantów nr 2013/09/N/NZ9/01655 i 2013/09/B/NZ9/01752 przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

2 – e-mail: [madamarszalek@gmail.com](mailto:madamarszalek@gmail.com)

## Stawonogi jako potencjalny wektor mechaniczny w rozprzestrzenianiu się ASFV w populacji dzików w Polsce\*

N. Mazur-Panasiuk<sup>1</sup>, M. Bruczyńska<sup>2</sup>, G. Woźniakowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

<sup>2</sup>Powiatowy Inspektorat Weterynarii w Piasecznie

Afrykański pomór świń (ASF) jest zakaźną chorobą wirusową świń i dzików o śmiertelności sięgającej 100%. Na terenie Europy choroba szerzy się konsekwentnie od 2007 r., jednakże w drugiej połowie 2018r. ASF niespodziewanie pojawił się również na terenie Chińskiej Republiki Ludowej będącej światowym liderem produkcji wieprzowiny, gdzie szybko rozprzestrzenił się na terenie całego kraju, oraz państw ościennych: Mongolii, Wietnamu, Korei Północnej, Kambodży i Laosu, powodując zachwianie światowego rynku wieprzowiny. Poznanie mechanizmów rozprzestrzeniania się wirusa ma kluczowe znaczenie w prewencji choroby.

Kleszcze miękkie z rodzaju *Ornithodoros* stanowią wektor biologiczny patogenu, niemniej jednak obszar ich występowania ograniczony jest do kontynentu afrykańskiego oraz południowych obszarów Europy, położonych w basenie Morza śródziemnego. W Europie na terenach występowania ASF u dzików, najliczniej występującym rodzajem kleszczy są tzw. kleszcze twarde, należące do gatunków *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, jednakże replikacja ASFV w ich organizmach nie jest możliwa. Główną drogę transmisji wirusa stanowi kontakt bezpośredni wrażliwych osobników z zakażonymi zwierzętami lub ich szczątkami. ASF wielokrotnie został potwierdzony w stadach towarowych liczących do kilkudziesięciu tysięcy sztuk trzody, spełniających wszystkie wymagania bioasekuracji. Pomimo szczegółowych dochodzeń epizootycznych, mechanizm transmisji choroby do takich stad nie został dotychczas poznany, jednakże badania przeprowadzone w Danii w 2018r udowodniły, iż muchy z gatunku *Stomoxys calcitrans* mogą stanowić potencjalny wektor mechaniczny patogenu w wyniku połknięcia przez swinie muchy zanieczyszczonej zakażoną krwią.

Aby potwierdzić możliwość mechanicznej transmisji ASFV przez stawonogi, zbadano obecność genomu ASFV w 25 kleszczach zidentyfikowanych jako *D. reticulatus* zebranych na terenie powiatu piaseczyńskiego, gdzie choroba powszechnie występuje w populacji dzika. 15 z nich pobrano ze świeżych szczątków padłych dzików, spośród których 11 stanowiły kleszcze w pełni najedzone krwią. Pozostałe 10 dorosłych kleszczy pochodziło z ubrań pracowników Inspekcji Weterynaryjnej, pracujących w lesie w związku z unieszkodliwianiem szczątków padłych zwierząt. Analiza real-time PCR potwierdziła obecność DNA wirusa ASF w 18 z 25 próbek; wśród których 14 pochodziło ze szczątków padłych dzików: najedzone (11/11) i pozostałe kleszcze (3/4). Ponadto, 4/10 osobników pobranych z ubrań również wykazało obecność genomu ASF. Wybrane 10 prób poddano następnie izolacji wirusa w hodowli komórek PBMC, w 8 przypadkach otrzymano wynik pozytywny.

Wyniki przeprowadzonych obserwacji stanowią pierwszy na świecie dowód na obecność zdolnego do infekcji ASFV w organizmach kleszczy z rodzaju *D. reticulatus* w warunkach naturalnych, co pozwala wnioskować, iż w pewnych sprzyjających okolicznościach, kleszcze twarde jako powszechny pasożyt dzików, może stanowić mechaniczny wektor transmisji ASF w populacji dzika w Europie.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt nr UMO-KNOW2016/PIWet-PIB/PRO2/01/1).

2 - e-mail: [natalia.mazur@piwet.pulawy.pl](mailto:natalia.mazur@piwet.pulawy.pl)

## Ptaki z rodziny *Laridae* – rezerwar gamma i deltakoronawirusów\*

J. Miłek, K. Domańska-Blicharz<sup>1</sup>

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

Koronawirusy (coronaviruses - CoVs) to liczna grupa patogenów należących do rodziny *Coronaviridae*, podrodziny *Orthocoronavirinae*. Dalsza klasyfikacja to rodzaj alfa- i betakoronawirusy, do których należą wirusy ludzi i zwierząt oraz gamma- i deltakoronawirusy, identyfikowane przede wszystkim u ptaków. GammaCoV reprezentowany przez koronawirus ptaków (avian coronavirus - AvCoV) to patogen drobiu wywołujący m.in. zakaźne zapalenie oskrzeli kur czy stany patologiczne jelit u indyków (koronawiroza indyków), który stanowi poważny problem zwłaszcza w wielkotowarowej produkcji drobiarskiej. GammaCoVs występują również u licznych gatunków ptaków wolnożyjących podobnie jak wirusy z rodzaju *Deltacoronavirus*. Co ważne to dzikie ptaki, szczególnie wodne ptactwo migrujące uważa się za naturalny rezerwar i źródło rozprzestrzeniania gamma- jak i deltakoronawirusów. Jednakże wciąż niewiele wiadomo o zróżnicowaniu genetycznym CoVs u poszczególnych grup taksonomicznych ptaków oraz ich roli w epidemiologii CoVs.

Celem podjętych badań była ocena występowania CoVs m.in. w populacji ptaków z rodziny mewowatych (*Laridae*), występujących na terenie Polski. Podjęto badania nad charakterystyką molekularną wykrytych CoVs, w tym również próbę uzyskania pełnej sekwencji genomu wykrytego deltaCoV u mewy śmieszki (*Chroicocephalus ridibundus*). W badaniach wykorzystano wymazy z kloaki w ilości 1015 szt., pobranych od dzikich ptaków w ramach monitoringu wirusa grypy ptaków (2009-2018). Do detekcji CoVs zastosowano metodę RT-PCT/nested PCR opracowaną dla fragmentu genu wirusowej polimerazy. Do uzyskania pełnej sekwencji genomowej wykorzystano metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS – next generation sequencing). Do przygotowania bibliotek zastosowano zestaw komercyjny Nextera XT DNA Library Preparation Kit, a sekwencjonowanie przeprowadzono z wykorzystaniem systemu MiSeq® (Illumina Inc, USA).

W przebadanym materiale obecność koronawirusów stwierdzono w 62 wymazach (6,1%) pochodzących od gatunków: mewa śmieszka, mewa siwa, mewa srebrzysta i rybitwa rzeczna. Wśród wykrytych wirusów zidentyfikowano 38 gammaCoV (61,3%) oraz 24 deltaCoV (38,7%). Przeprowadzona analiza filogenetyczna gammaCoVs wykazała duże podobieństwo (97% - 99,5%) do sekwencji CoV wykrytych u mew na terenie Finlandii, wysp Komandorskich, a także u australijskiego kamusznika zwyczajnego. Z kolei polskie deltaCoVs wykazały wysoką homologię (94,1 - 98,1%) do wirusów identyfikowanych u mew z obszaru Finlandii.

Dzięki zastosowaniu metody NGS uzyskano pełną sekwencję deltakoronawirusa pochodzącego od mewy śmieszki. Rozmiar genomu analizowanego wirusa wynosił 26 102 nukleotydy, z zawartością par zasad G+C na poziomie 39%. Podobnie jak u innych koronawirusów genom ten posiada typowy układ i obejmuje dziesięć otwartych ramek odczytu (ORF - open reading frames), gdzie pierwsze 2/3 wirusowego RNA od strony 5' zajmuje ORF1ab replikazy i 1/3 geny kodujące białka strukturalne S-M-E-N. Filogeneza oparta o pełne sekwencje genomowe wykazała bliskie podobieństwo deltaCoV mewy (96,9-97,4%) do deltaCoVs zidentyfikowanych u sokoła (UAE-HKU27) i gołębia (UAE-HKU2) w Zjednoczonych Emiratach Arabskich.

Uzyskane wyniki potwierdzają, iż ptaki z rodziny *Laridae* są gospodarzem zarówno dla gamma- jak i deltaCoVs. Wyniki sugerują również, że mewy mogą pełnić ważną rolę w rozprzestrzenianiu CoVs na znaczne odległości a także stanowić źródło wymiany genowej koronawirusów.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt nr KNOW2015/CB/PRO1/33).

1 – e-mail: [domanska@piwet.pulawy.pl](mailto:domanska@piwet.pulawy.pl)

## Wzorce wykrywania parwowirusów świń 1-6 (PPV1-PPV6) na polskich fermach świń\*

D. Miłek<sup>1,3</sup>, A. Woźniak<sup>1</sup>, M. Guzowska<sup>2</sup>, T. Stadejek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Katedra Nauk Fizjologicznych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

Parwowirus świń 1 (porcine parvovirus 1, PPV1) jest głównym czynnikiem wywołującym zaburzenia w rozrodzie u trzody chlewnej. W ciągu ostatnich dwóch dekad wykryto wiele nowych parwowirusów świń, którym w nazwie nadano kolejno numery od 2 do 6 (porcine parvovirus 2-6, PPV2-PPV6). Dokładna rola nowych parwowirusów świń dla zdrowia trzody chlewnej jest do tej pory nie znana. Przypuszcza się, że PPV4, PPV6 i PPV7 mogą mieć wpływ na zaburzenia w rozrodzie, a PPV2 podejrzewany jest o związek z chorobami układu oddechowego.

Celem badania było określenie występowania parwowirusów na fermach świń w różnych grupach wiekowych zwierząt (prosięta, warchlaki, tuczniki) oraz ocena przydatności diagnostycznej różnych materiałów biologicznych (płyn ustny, surowica, kał) do wykrywania parwowirusów.

Ogółem pobrano 271 próbek płynu ustnego, 1244 próbek surowicy i 1238 próbek kału od świń w wieku 3-21 tygodni życia z 19 ferm. Przed ekstrakcją materiału genetycznego próbki surowicy i kału pulowano po 4-6. Łącznie badaniom poddano 150 próbek płynu ustnego, 254 pul surowic i 252 pule kału. Wyizolowany materiał genetyczny zbadano testem real-time PCR. Analizę statystyczną danych przeprowadzono w programie R (wersja 3.5.1). Test Fishera został wykorzystany do oceny różnic w występowaniu PPV1-PPV6, a przy pomocy modelu regresji logistycznej określono prawdopodobieństwo wykrycia tych wirusów w różnych grupach wiekowych i rodzajach materiału biologicznego.

Otrzymane wyniki wykazały, że parwowirusy świń są powszechne w Polsce. Spośród wszystkich zbadanych grup wiekowych i materiałów biologicznych wirusy były najczęściej wykrywane odpowiednio u tuczników i w próbkach płynu ustnego. W grupie tuczników najrzadziej wykrywany był PPV1 (8,6%), a najczęściej PPV2 (49,1%). W próbkach płynu ustnego również stwierdzono podobny zakres występowania wirusów, który wahał się od 10,7% (PPV1) do 48,7% (PPV2). Prawdopodobieństwo wykrycia parwowirusów świń u prosiąt i warchlaków było mniejsze niż u tuczników odpowiednio o 84,0-99,0% i 53,0-74,0%. W przypadku występowania parwowirusów w różnych materiałach diagnostycznych prawdopodobieństwo wykrycia w surowicy i kale, w porównaniu z płynem ustnym, było mniejsze odpowiednio o 53,0-74,0% i 61,0-80,0%.

Parwowirusy świń były wykryte głównie u warchlaków i tuczników, a infekcja trwała do końca tuczu, co może świadczyć o przewlekłym przebiegu zakażenia (zwłaszcza w przypadku PPV2, który powszechnie występował we wszystkich grupach wiekowych świń). Szczególnie niskie wartości Ct (Cycle threshold) w próbkach surowicy, w których wykryto PPV2, PPV3, PPV5 i PPV6, sugerują, że wirusy te mogą powodować wysoki poziom wirēmii przynajmniej u jednego osobnika z puli. Dalsze badania są potrzebne, aby określić dokładny poziom wirēmii u osobników indywidualnych i konsekwencje tak intensywnej replikacji wirusów na zdrowie świń. Dodatkowo warto określić wpływ zakażeń parwowirusami na infekcje spowodowane innymi, dobrze poznanymi patogenami świń, takimi jak cirkowirus świń typu 2 (PCV2) oraz wirus zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRSV) ze względu na wieloczynnikowe choroby, które występują powszechnie w produkcji trzody chlewnej.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego decyzja nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt nr KNOW2015/CB/PRO1/39).

3 – e-mail: [dagmara\\_milek@sggw.pl](mailto:dagmara_milek@sggw.pl)

# Transkryptomyczna analiza odpowiedzi komórek MDBK na zakażenie wirusem biegunki bydła i choroby błon śluzowych\*

P. Mirosław<sup>1</sup>, M. Rola-Łuszczak<sup>2</sup>, M. P. Polak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

<sup>2</sup>*Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV-MD) jest odpowiedzialny za znaczące straty ekonomiczne w hodowli bydła jednak niewiele wiadomo na temat reakcji gospodarza na zakażenie tym patogenem. Wirus początkowo przenika do komórek nabłonkowych, a następnie do limfocytów gdzie się namnaża i rozprzestrzenia po całym układzie limfatycznym. BVDV-MD może oddziaływać na prawie każdy narząd, co jest przyczyną szerokiego spektrum objawów klinicznych. Aby zrozumieć skomplikowaną etiologię tej choroby, ważne jest określenie cech interakcji wirus-gospodarz. Celem badań była analiza różnic na poziomie transkryptomu bydlęcych komórek zakażonych wirusem BVD-MD.

W badaniach wykorzystano ciągłą linię komórkową nerki bydlęcej - Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). Hodowlę MDBK przygotowano na minimalnej pożywce podstawowej (MEM-E) (Sigma) z dodatkiem surowicy bydlęcej i antybiotyków. Linie utrzymywane były w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. W badaniu wykorzystano wirusy terenowe należące do podtypów 1f oraz 1b namnożone wcześniej w hodowli komórkowej. Komórki MDBK zakażano metodą adsorpcji na wyrośniętą hodowlę. Następnie utrwaloną hodowlę znakowano w teście immunoperoksydazowym w celu określenia miana zakaźnego TCID<sub>50</sub> metodą Reeda-Muncha. Równolegle, w celu uzyskania materiału z komórek kontrolnych prowadzono hodowlę komórek MDBK nie zakażonych. Całkowite RNA izolowano z komórek 24h i 72h po zakażeniu za pomocą zestawu RNase mini kit (Qiagen). Całkowity RNA został przepisany na cDNA, po którym zsyntetyzowano znakowane cy-3 (komórki niezakażone) oraz cy-5 (komórki zakażone) cRNA. cRNA oczyszczono i pofragmentowano. Przeprowadzono hybrydyzację oraz skanowanie w systemie dwu-kolorowym (Bovine V2 Gene Expression Microarrays, Agilent). Sygnały między każdą macierzą zostały znormalizowane przy użyciu programu GenSpring. Do analizy statystycznej wykorzystano test t-Studenta przy poziomie istotności  $P < 0,05$ , zaś do analizy szlaków wykorzystano serwis Panther.

Stwierdzono zmienioną ekspresję szeregu genów. W pierwszej dobie po zakażeniu wykryto 32 geny, których ekspresja zmieniła się ponad 3-krotnie. Po 3 dniach ich liczba wzrosła do 74. Najwyższą, ośmiokrotną różnicę w ekspresji w stosunku do komórek niezakażonych wykazał gen kodujący metalotioneinę 2A po 72h p.z. Do zidentyfikowania szlaków uwzględniono wszystkie geny, których ekspresja zmieniła się ponad 1,5-raza. Najwięcej genów, dla których aktywność uległa zmianie, uczestniczy w procesie zapalenia wywołanego przez chemokiny i cytokiny, oraz transdukcji sygnału za pośrednictwem białek G, PDGF czy integrin jak również geny związane ze szlakiem CCKR, interleukin, aktywacji komórek T oraz Wnt.

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

## Ocena narażenia zwierząt gospodarskich na mikotoksyny w paszach\*

Ł. Panasiuk<sup>1,2</sup>, P. Jedziniak<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>*Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Mikotoksyny są to wtórne metabolity grzybów pleśniowych, obecne powszechnie w paszach. Stanowią istotny problem w toksykologii weterynaryjnej, wykazując właściwości teratogenne, neurotoksyczne, kancerogenne, teratogenne bądź estrogenne. Z toksykologicznego punktu widzenia najważniejszymi mikotoksynami są: aflatoksyna B<sub>1</sub>, deoxynivalenol (DON), zearalenon (ZEN), ochratoksyna, fumonizyny B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> (FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub>) oraz toksyna T-2 i HT-2.

Ostatnio dużo uwagi poświęca się także metabolitom mikotoksyn, powstającym w wyniku biotransformacji przeprowadzonej przez grzyby, bakterie, bądź rośliny. Te modyfikowane mikotoksyny są szczególnie istotne, gdyż mogą mieć toksyczność zdecydowanie wyższą niż forma podstawowa (np. ZEN metabolizowany do  $\alpha$ -zearalenolu), bądź w wyniku trawienia w przewodzie pokarmowym mogą być uwalniane do toksycznej formy podstawowej przez odłączenie reszty cukrowej (np. deoksynivalenol-3-glukozyd; DON-3Glc), co skutkuje niedoszacowanymi wynikami monitorowanych pasz. Z drugiej strony badacze coraz częściej zwracają uwagę na występowanie tzw. „emerging mycotoxins” w paszach. Ciągłe niewiele jest informacji na temat ich toksyczności oraz ich możliwym działaniu synergistycznym bądź addytywnym gdyż bardzo często współwystępują w materiałach paszowych. Dlatego też, Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności opublikował już kilka raportów, w którym podkreśla konieczność ciągłego monitorowania poziomów „emerging mycotoxins” (np. enniatyny; ENNs, bowerycyna; BEA czy toksyny *Alternaria*) w paszach oraz żywności, a także wskazuje potrzebę kolejnych badań toksykologicznych, gdyż obecna wiedza nie pozwala na przeprowadzenie prawidłowej oceny narażenia i ryzyka.

Dlatego też, wykorzystując uprzednio opracowane i opublikowane<sup>3</sup> metody analityczne zostały przebadane próbki pasz dla zwierząt gospodarskich: dla świń (66 pasz), dla drobiu (98 pasz) oraz dla bydła (72 pasze) pod kątem 53 mikotoksyn, zarówno tych regulowanych prawnie, modyfikowanych jak również „emerging mycotoxins”. Metodyka opierała się na wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Uzyskane wyniki stężeń poszczególnych pasz zostały wykorzystane do przeprowadzenia oceny narażenia zwierząt pod kątem wybranych mikotoksyn.

Wyniki przebadanych 236 próbek pasz wskazują, że spośród wszystkich analitów najczęściej oznaczane były ENNs, BEA, DON oraz ZEN obecne w ponad 75% przebadanych próbek. Co więcej, w ponad 69% próbkach stwierdzanych było przynajmniej 10 toksyn. W przypadku analiz mikotoksyn modyfikowanych na uwagę zasługują stężenia DON-3Glc, które stanowiły około 20% macierzystego analitu. Z przeprowadzonej oceny narażenia pod kątem występowania DON i jego metabolitów w paszach wynika, że świnię są umiarkowanie narażone - w 23 próbkach pasz stwierdzono przekroczenia względem wartości chronicznego narażenia na DON u tuczników (wartość ta wynosi 12,5  $\mu$ g/kg m.c/dzień). W przypadku pasz dla drobiu oraz bydła przekroczenia tej wartości odpowiadającej danej grupie zwierząt była znacznie niższa (w poniżej 8% przebadanych pasz). Uzyskane rezultaty pokazują, że świnię spośród zwierząt gospodarskich są najbardziej narażone na szkodliwe działanie mikotoksyn dlatego też największy nacisk powinien być kładziony na bezpieczeństwo pasz tej grupy zwierząt.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr

2 - e-mail: [lukasz.panasiuk@piwet.pulawy.pl](mailto:lukasz.panasiuk@piwet.pulawy.pl)

<sup>3</sup>Panasiuk, L., et al. "Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. "Mycotoxin research" 35.1 (2019): 17-25.

## **Zmiany w ekspresji pinopsyny w szyszynce indyka domowego w trakcie rozwoju powylęgowego\***

M. Petruszewicz-Kosińska, B. Przybylska-Gornowicz

*Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

Wspólną cechą pinealocytów ptaków jest ich wrażliwość na światło, którą zawdzięczają obecności światłoczułych barwników m.in. pinopsynie. Do tej pory barwnik ten wykryto w szyszynce kury, gołębia i przepiórki. Jego obecność stwierdzono głównie w wypustkach pinealocytów.

Szyszynka indyków, przedmiot naszych badań, jest narządem typu pęcherzykowo-kanalikowego. Mięsz szyszynki tworzą owalne lub okrągłe pęcherzyki różnej wielkości, otoczone tkanką łączną. Ściany pęcherzyka tworzą pinealocyty szczątkowo-receptorowe (o wydłużonym kształcie) i pinealocyty wydzielnicze (wielokształtne) oraz ependymo-podobne i astrocyto-podobne komórki podporowe. Budowa pinealocytów i proporcje między nimi ulegają zmianie w trakcie rozwoju powylęgowego. Celem niniejszej pracy było zbadanie czy zmianom podlega także ekspresja pinopsyny.

Materiał do badań stanowiły szyszynki pobrane od indyków w wieku dwóch dni oraz dwóch, dziesięciu, dwudziestu i czterdziestu tygodni życia, utrzymywanych w kontrolowanych warunkach oświetlenia (12L:12D). Szyszynki pobierano bezpośrednio po eutanazji ptaków, utrwalało w 4% paraformaldehynie w 0,1 M buforze fosforanowym oraz poddawano krioprotekcji w 30% roztworze sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym, a następnie mrożono. Skrawki mrożeniowe barwiono z użyciem pierwotnego mysiego przeciwciała przeciwko pinopsynie, a następnie badano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Dodatnią reakcję na obecność pinopsyny stwierdzono we wszystkich okresach życia postnatalnego badanych indyków. U dwudniowych i dwutygodniowych ptaków dodatnią reakcję na obecność pinopsyny zaobserwowano głównie w wypustkach wierzchołkowych pinealocytów szczątkowo-receptorowych, ograniczających światło pęcherzyka. W szyszynkach ptaków dziesięcioletniowych ekspresję pinopsyny stwierdzono w wypustkach pinealocytów szczątkowo-receptorowych, a także w krótkich wypustkach odchodzących od pinealocytów typu wydzielniczego, zlokalizowanych w obwodowych częściach ścian pęcherzyków. U dwudziesto- i czterdziestotygodniowych indyków immuno-pozytywne wypustki wierzchołkowe pinealocytów szczątkowo-receptorowych były krótsze i mniej gęsto rozmieszczone niż u młodszych ptaków w przeciwieństwie do pozytywnych wypustek obserwowanych na obwodowej części ścian pęcherzyka, które były bardzo liczne.

Reasumując, obecność pinopsyny stwierdzono w szyszynce we wszystkich badanych okresach życia indyków w pinealocytach szczątkowo-receptorowych i wydzielniczych, co wskazuje na światłoczułość obu typów komórek. Wraz z wiekiem wzrasta liczba pinopsyno-pozytywnych pinealocytów wydzielniczych, a maleje szczątkowo-receptorowych.

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

## Markery autofagii podczas zakażenia końskim herpeswiryusem typu 1\*

I. Serafińska<sup>1,2</sup>, J. Cymerys-Bulenda<sup>1</sup>, M. Chodkowski<sup>1</sup>, A. Golke<sup>1</sup>, A. Słońska-Zielonka<sup>1</sup>,  
M. W. Bańbura<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
w Warszawie*

Autofagia to proces, podczas którego cytoplazma wraz z znajdującymi się w niej cząsteczkami, np. białkami, organellami, mikroorganizmami, itp. zamykana jest w autofagosomach i degradowana za pomocą enzymów lizosomalnych. Proces ten zachodzi we wszystkich komórkach, ponieważ pozwala na utrzymanie homeostazy. Dzięki niemu komórka może usunąć nagromadzone agregaty białkowe, niepotrzebne lub uszkodzone białka, czy dysfunkcyjne organelle. Zazwyczaj, ulega on stymulacji na skutek czynnika stresowego, np. niedoborów składników odżywczych, bądź podczas zakażenia wirusowego lub bakteryjnego. Za markery autofagii uważa się białko LC3B (podczas autofagii ulega przemianie z formy cytozolowej (LC3b-I) do lipidowej (LC3B-II), która bierze udział w formowaniu się pęcherzyka autofagosomalnego) oraz p62/SQSTM1 (łączy się z białkami przeznaczonymi do degradacji i ulega trawieniu w autofagolizosomie). Podczas zakażenia wirusowego autofagia może być hamowana lub ulegać stymulacji, a jej rola podczas zakażenia końskim herpeswiryusem typu-1 jest wciąż nieznana.

Pierwotne hodowle mysich neuronów zostały zakażone trzema szczepami EHV-1 (Jan-E, Rac-H i EHV-1 26), a następnie poddane analizie 2, 24 i 48 godzin po zakażeniu (g. p. z.). Próby analizowano metodą Western Blott, oraz za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego.

Analiza Western Blott pokazała, że podczas zakażenia EHV-1 stosunek LC3B-II do LC3B-I, który obrazuje przepływ autofagosomalny, 2 i 24 g.p.z. jest na podobnym poziomie jak w komórkach kontrolnych, natomiast 48 g.p.z. uległ podwyższeniu. Poziom białka p62/SQSTM1 podczas zakażenia wirusem był wyższy niż w komórkach kontrolnych. Analiza fluorescencji z użyciem mikroskopu konfokalnego wykazała zwiększające się nagromadzenie sygnału pochodzącego od antygenów wirusowych w kolejnych punktach czasowych. Sygnał fluorescencji białka LC3B, był porównywalny lub niższy niż uzyskany w komórkach kontrolnych, natomiast sygnał pochodzący od białka p62 był intensywniejszy w komórkach zakażonych.

Wyniki mogą świadczyć o hamowaniu procesu autofagii podczas zakażenia końskim herpeswiryusem typu 1. Inhibicja tego procesu może stanowić formę ochrony przed degradacją wirusa w komórce.

---

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

2 – e-mail: [iza.serafinska@gmail.com](mailto:iza.serafinska@gmail.com)

## Porównanie statusu energetycznego po dojrzewaniu *in vitro* oocytów bydłych pobranych z pęcherzyków antralnych, od zwierząt niedojrzałych i dojrziałych płciowo\*

J. Staszekiewicz-Chodor<sup>1,2</sup>, E. Sinderewicz<sup>1</sup>, D. Boruszewska<sup>1</sup>, K. Suwik<sup>1</sup>,  
I. Kowalczyk-Zięba<sup>1</sup>, I. Wocławek-Potocka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

Każdy oocyt znajdujący się w pęcherzyku jajnikowym otoczony jest komórkami ziarnistymi, z którymi tworzy kompleks oocyt-komórki wzgórka jajonośnego (COC). Dojrzewanie COCs jest kluczowym elementem produkcji zarodków bydłych *in vitro*. Podczas dojrzewania oocytu, komórki wzgórka jajonośnego ulegają ekspansji, która jest kontrolowana m.in. przez naskórkowe czynniki wzrostu i metaloproteiny. W kompleksie, komórki ziarniste dostarczają do oocytu substancje odżywcze i substraty energetyczne. Glukoza dociera do komórek ziarnistych przy udziale transporterów glukozy (GLUTs), a następnie jest metabolizowana na szlaku heksozaminowym do kwasu hialuronowego, przy udziale transaminaz glutamino-fruktozo-6-fosforanowych (GFPTs) lub na drodze glikolizy, do pirogronianu lub mleczanu, przy udziale enzymów fosfofruktokinazy (PFKP) i dehydrogenazy mleczanowej (LDHA).

Celem badań było zbadanie szlaku metabolizmu glukozy, po dojrzewaniu *in vitro* oocytów bydłych, w komórkach wzgórka jajonośnego otaczających oocyty bydłe pobrane z pęcherzyków antralnych, od zwierząt dojrziałych i niedojrzałych płciowo, a także określenie stopnia ekspansji komórek wzgórka jajonośnego.

COCs pobierano z pęcherzyków antralnych samic dojrziałych (>12 miesięcy) i niedojrzałych płciowo (0-6 miesięcy). Pozyskane COCs poddawane były 24-godzinemu dojrzewaniu *in vitro* w odpowiednich warunkach. Po dojrzewaniu, od oocytów mechanicznie oddzielono komórki wzgórka jajonośnego, w których następnie metodą Real-Time PCR określono ekspresję mRNA genów odpowiadających za transport i metabolizm glukozy: *GLUT1*, *GLUT4*, *GFPT1*, *GFPT2*, *PFKP* i *LDHA* oraz genów zaangażowanych w ekspansję komórek wzgórka jajonośnego: *AREG*, *EREG*, *BTC*, *ADAM10*, *ADAM17*, *EGFR*, *TNFAIP6*, *PTX3*, *HAS2*, *PTGS2*.

Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję mRNA *GLUT4* w komórkach wzgórka jajonośnego pochodzących od zwierząt dojrziałych płciowo ( $P<0,05$ ). Wykazano także istotnie wyższą ekspresję mRNA *GFPT2* w komórkach wzgórka jajonośnego pochodzących od krów niedojrzałych płciowo, natomiast ekspresja mRNA *PFKP* i *LDHA* była istotnie wyższa w komórkach wzgórka jajonośnego pochodzących od zwierząt dojrziałych płciowo ( $P<0,05$ ). Uzyskane wyniki sugerują, że w komórkach wzgórka jajonośnego pochodzących od zwierząt niedojrzałych płciowo, dominującym szlakiem metabolizmu glukozy jest szlak heksozaminowy, którego produktem końcowym jest kwas hialuronowy, natomiast w komórkach wzgórka jajonośnego pochodzących od zwierząt dojrziałych płciowo dominuje glikoliza, z produktem końcowym w postaci pirogronianu lub mleczanu. Wykazano także istotnie wyższą ekspresję mRNA genów zaangażowanych w ekspansję komórek wzgórka jajonośnego: *AREG*, *EREG*, *BTC*, *EGFR*, *ADAM17*, *PTGS2* i *PTX3* w grupie zwierząt niedojrzałych płciowo ( $P<0,05$ ), co wskazuje na efektywniejszą ekspansję komórek wzgórka jajonośnego w tej grupie zwierząt.

Poznanie statusu energetycznego oocytów pozyskanych od krów dojrziałych i niedojrzałych płciowo po dojrzewaniu *in vitro* pozwoli na optymalizację tego procesu i poprawę jego efektywności, a co za tym idzie, uzyskanie większej liczby zarodków wyhodowanych *in vitro*. Optymalizacja tego procesu w przypadku oocytów pozyskanych od krów niedojrzałych płciowo może przyczynić się do zmniejszenia odstępu międzypokoleniowego w rozrodzie bydła.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr UMO-KNOW2016/IRZiBŻ/PRO1/01/4).

2 - e-mail: [j.staszekiewicz-chodor@pan.olsztyn.pl](mailto:j.staszekiewicz-chodor@pan.olsztyn.pl)

## Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych LA/ALA na proteom wątroby myszy\*

K. Stepanow<sup>1</sup>, A. Lepczyński<sup>2</sup>, A. Nawrocka<sup>1</sup>, M. Ogłuszka<sup>1</sup>, A. Szostak<sup>1,3</sup>, P. Urbański<sup>1</sup>, E. Poławska<sup>1</sup>, M. Pierzchała<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Genomiki i Bioróżnorodności, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu*

<sup>2</sup>*Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin*

<sup>3</sup>*Wydział Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa*

Kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 pełnią istotną rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu organizmu człowieka, który nie jest w stanie syntetyzować kwasów  $\alpha$ -linolenowego (ALA, 18:3n-3) i linolowego (LA, 18:2n-6) z kwasu oleinowego (18:1n-9). Wymagane jest dostarczanie tych kwasów wraz z pokarmem. Kwasy z grup n-3 i n-6 charakteryzuje odmienne działanie. Z tego powodu stosunek tych kwasów w diecie odgrywa kluczową rolę dla zachowania homeostazy organizmu, m.in. pochodne kwasów n-6 wykazują właściwości prozapalne, a kwasów n-3 wygaszające. W szlakach przemian kwasów n-6 i n-3 uczestniczą te same enzymy, dlatego przewaga LA w diecie hamuje syntezę EPA i DHA. Współczesna dieta określana mianem „Western diet” cechuje się zwiększoną konsumpcją produktów bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe (NKT) oraz kwasy n-6, przy jednocześnie niskiej zawartości kwasów n-3. Stosunek kwasów n-6/n-3 w tej diecie może wynosić 10:1 – 20:1, co wpływa niekorzystnie na stan zdrowia.

Doświadczenie obejmowało 64 samce myszy linii Swiss Webster podzielonych na 6 grup (n=8). Grupę kontrolną stanowiły osobniki żywione paszą o niskiej zawartości WNKT i wysokiej zawartości NKT. Grupy doświadczalne były żywione paszami o wysokim poziomie WNKT, a różnym wzajemnym stosunku LA/ALA wynoszącymi ok. 14:1 oraz 5:1. Doświadczenie było prowadzone w dwóch przedziałach czasowych: 3 i 6 miesięcy. Rozdział białek wątroby został wykonany techniką elektroforezy dwukierunkowej. Ogniskowanie izoelektryczne przeprowadzono w 17 cm paskach IPG o gradiencie pH 3-10, a następnie białka rozdzielono według mas cząsteczkowych w 12% żelu SDS-PAGE. Po zdigitalizowaniu żeli barwionych błękitem Coomassie uzyskane obrazy 96 żeli poddano analizie z użyciem programu PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad). Wybrane spoty białkowe, o statystycznie istotnie różnej relatywnej koncentracji ( $p < 0,02$ ) zostały zidentyfikowane przy użyciu spektrometru mas typu MALDI-TOF/TOF. W celu poznania powiązań między białkami i ich udziału w procesach biologicznych wykorzystano bazę danych STRING v11.0.

W wątrobach zwierząt żywionych dietami doświadczalnymi o stosunku LA/ALA 5:1 w porównaniu do grup kontrolnych zaobserwowano zarówno obniżenie relatywnej koncentracji białek m.in. FTL1, HMGCS2, a także jej wzrost ACAT2 i HAAO. Suplementacja diety WNKT o stosunku LA/ALA 14:1 spowodowała wzrost relatywnej koncentracji ALDH8A1 i BHMT, oraz obniżenie relatywnej koncentracji ACAA2 i HMGCS2. Po 6 miesiącach suplementacji diety WNKT w przypadku obu grup zaobserwowano wzrost koncentracji HSPA1A i PRDX4, a także obniżenie koncentracji KHK, FTCD i INMT. Suplementacja diety WNKT spowodowała wzrost relatywnej koncentracji grup białek zaangażowanych w metabolizm kwasów karboksylowych, biosyntezę i degradację aminokwasów. Powodowała również wzrost koncentracji białka szoku cieplnego Hspala i peroksyredoksyny 4, co może świadczyć o zaangażowaniu ich w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez WNKT.

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

4 – e-mail: [k.stepanow@ighz.pl](mailto:k.stepanow@ighz.pl)

## Wpływ anemii na tle niedoboru żelaza na wzrost i rozwój mięśni szkieletowych u młodych prosiąt\*

M. Szudzik, P. Lipiński, A. Jończy, R. Mazgaj i R.R. Starzyński

*Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu*

Niedokrwistość na tle niedoboru żelaza (*Iron Deficiency Anemia*, IDA) jest częstym zaburzeniem występującym u ludzi. Najbardziej narażoną grupą są noworodki a szczególnie wcześniaki. Niedobór żelaza i związana z nim niedokrwistość są również rozpowszechnione u prosiąt większości ras świń domowej w okresie przed odsadzeniem od matek i mogą negatywnie wpływać na rozwój i wzrost mięśni szkieletowych. Celem doświadczenia było zbadanie wpływu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza na wzrost i rozwój mięśni szkieletowych u 28-dniowych prosiąt, jak również na ekspresję wybranych genów metabolizmu żelaza w tej tkance.

Do badania użyto 28-dniowych prosiąt (linia 990) suplementowanych żelazem (iniekcja domięśniowa dekstranem żelaza) oraz prosiąt niesuplementowanych. Od zwierząt pobrano próbki krwi, mięśnia łydki i wątroby. Analizowano parametry czerwonych krwinek, status żelaza w osoczu krwi, jego zawartość żelaza w mięśniach, ekspresję genów związanych z metabolizmem żelaza oraz genów regulujących wzrost i rozwój mięśni szkieletowych.

Wartości parametrów czerwonych krwinek wyraźnie wskazywały na występowanie anemii na tle niedoboru żelaza w grupie zwierząt niesuplementowanych. Nie stwierdzono jednak różnic w zawartości żelaza w tkance mięśniowej prosiąt z dwóch badanych grup. Co istotne, w mięśniach zwierząt z niedokrwistością stwierdzono zmniejszony rozmiar włókien mięśniowych. Pomimo znacznego zmniejszenia ekspresji mRNA hepcydyny (kodującego peptyd inicjujący degradację ferroportyny, jedynegoazanego dotąd białka transportującego żelazo z komórek do środowiska pozakomórkowego) w wątrobie, poziom białka ferroportyny w mięśniach prosiąt z niedokrwistością był istotnie statystycznie niższy w porównaniu ze zwierzętami suplementowanymi żelazem. Wydaje się, że ekspresja ferroportyny w mięśniach szkieletowych jest regulowana miejscowo przez hepcydynę syntezowaną w mięśniach (stwierdzono zwiększony poziom mRNA hepcydyny w mięśniu łydki), co ma na celu retencję żelaza w tkance mięśniowej w warunkach ogólnoustrojowego niedoboru tego mikroelementu. Analiza ekspresji genów potencjalnie prowadzących do zaniku mięśni, takich jak miostatyna, receptor miostatyny ACT11B, receptor BMP 2 (mięśnie) i IGF1 (wątroba) sugerują, że rozwój i wzrost mięśni szkieletowych u 28-dniowych niedokrwistych prosiąt może być osłabiony.

---

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr KNOW/IGHZ/RMK/PhD/2016/01, 1.09.2016-1.09.2019)

# Wpływ bisfenolu A (BPA) na neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowego układu nerwowego w jelicie cienkim świni domowej\*

K. Szymańska<sup>1,2</sup>, S. Gonkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UW-M w Olsztynie*

Bisfenol A (BPA) jest stosowany w produkcji tworzyw sztucznych służących do wyrobu wielu przedmiotów codziennego użytku. Wykazano, że może on oddziaływać negatywnie na organizmy żywe, szczególnie na układ nerwowy, pokarmowy i endokrynną. Celem niniejszych badań było wykazanie zmian w neurochemicznej charakterystyce neuronów jelitowego układu nerwowego (ang. *enteric nervous system*, ENS) znajdującego się w ścianie jelita cienkiego świni domowej.

Określono wpływ BPA na neurony ENS dwunastnicy, jelita czczego i biodrowego immunoreaktywnych wobec galaniny (GAL), pęcherzykowego transportera acetylocholino (VACHT), substancji P (SP), naczynioaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP) i peptydu CART. Wykonano także badanie histopatologiczne ściany jelita biodrowego i oznaczenie poziomu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , i IL-1 $\beta$  w kępkach Peyera przy pomocy testu ELISA.

## Wykazano, że:

1. Neurony ENS w jelicie cienkim w warunkach fizjologicznych charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem pod względem neurochemicznym i wykazują immunoreaktywność wobec CART, GAL, SP, VACHT oraz VIP. Odsetek tych neuronów zależy od rodzaju zwoju ENS, jak i od odcinka jelita cienkiego.
2. Niskie i wysokie dawki BPA wpływają na neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowych w jelicie cienkim świni domowej i są zdecydowanie wyraźniejsze pod wpływem wysokich dawek toksyny (wzrost liczby neuronów immunoreaktywnych wobec VIP, GAL, peptydu CART i/lub SP spadek liczby komórek VACHT – pozytywnych).
3. Wysokie dawki BPA powodują zmiany w obrazie histologicznym ściany jelita biodrowego świadczące o stanie zapalnym oraz (w przeciwieństwie do niskich dawek) powodują zwiększenie poziomu IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  w kępkach Peyera jelita biodrowego.

## Z tego zakresu zostały opublikowane trzy prace:

1. Szymańska K, Gonkowski S. Bisphenol A-Induced changes in the enteric nervous system of the porcine duodenum. *Neurotoxicology*. 2018;66:78-86. **IF 3.263, 30 pkt.**
2. Szymańska K, Makowska K, Gonkowski S. The influence of high and low doses of bisphenol A (BPA) on the enteric nervous system of the porcine ileum. *Int J Mol Sci*. 2018;19:917. **IF 4.183, 30 pkt.**
3. Szymańska K, Gonkowski S. Neurochemical characterization of the enteric neurons within the porcine jejunum in physiological conditions and under the influence of bisphenol A (BPA). *Neurogastroent. Motil*. 2019;31:e13580. **IF = 3.803, 30 pkt.**

**Praca doktorska, o tym samym tytule co niniejsze doniesienie, jest już po recenzjach.**

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, decyzja nr 05-1/KNOW2/2015.

2 – e-mail: [kamila.szymańska@uwm.edu.pl](mailto:kamila.szymańska@uwm.edu.pl)

## **Wyniki oznaczania syntetycznych barwników organicznych w wybranych wodach powierzchniowych Polski\***

A. Tkaczyk<sup>1,2</sup>, K. Mitrowska<sup>1</sup>, A. Posyniak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Ze względu na postępujące zanieczyszczenie środowiska wodnego kontrola jakości wód powierzchniowych jest potrzebna. Szczegółowa analiza chemiczna jakości wody jest niezbędna w celu zapewnienia bezpieczeństwa korzystania z zasobów środowiska wodnego. Prowadzone dotychczas badania potwierdziły zanieczyszczenie wód powierzchniowych Polski między innymi takimi związkami jak: metale ciężkie, pestycydy oraz związki farmakologicznie czynne takie jak antybiotyki, hormony steroidowe, leki hipolikemiczne czy też niesteroidowe leki przeciwzapalne. Ze względu na właściwości farmakologiczne wybranych syntetycznych barwników organicznych jak również fakt, że niektóre barwniki wykazują właściwości toksyczne ich obecność w środowisku wodnym może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów wodnych, a przez to stanowić także zagrożenie dla zdrowia ludzi. Ponadto obecność syntetycznych barwników organicznych w wodach powierzchniowych może być przyczyną występowania pozostałości tych substancji w mięśniach ryb, mięczaków i skorupiaków hodowanych w gospodarstwach, do których woda doprowadzana jest w sposób otwarty.

Pierwszym etapem badań było pobranie materiału z wybranych wód powierzchniowych. Punkty wytypowane do pobrania materiału do badań stanowiły miejsca, w których działalność człowieka mogła wskazywać na stosowanie syntetycznych barwników organicznych oraz miejsca wolne od tych substancji. Próbkę wody do badań pobrano z wód powierzchniowych płynących (rzeka, potok) lub stojących (jezioro, staw, zalew) z obszaru wszystkich województw kraju. Dodatkowo z terenu oczyszczalni ścieków komunalnych pobrano próbki ścieku oczyszczonego, który doprowadzany jest bezpośrednio do rzeki. Następnie opracowaną wcześniej metodą analityczną oznaczania 22 syntetycznych barwników organicznych w wodzie za pomocą techniki ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas przebadano zebrany materiał.

W przeanalizowanym materiale pochodzącym z wybranych wód powierzchniowych Polski nie stwierdzono obecności żadnego z oznaczanych syntetycznych barwników organicznych. Natomiast w dwóch próbkach stanowiących ściek oczyszczony pobrany z oczyszczalni komunalnych stwierdzono obecność zieleni malachitowej (0,02 µg/L-0,05 µg/L) oraz zieleni leukomalachitowej (0,02 µg/L). Uzyskane wyniki wskazują, że polskie wody powierzchniowe są wolne od zanieczyszczenia syntetycznymi barwnikami organicznymi. Natomiast analiza ścieków oczyszczonych wykazała obecność śladowych ilości takich syntetycznych barwników organicznych jak zieleń malachitowa oraz zieleń leukomalachitowa, czego przyczyną może być niewystarczające oczyszczanie chemiczne ścieku surowego.

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

2 - email: [angelika.tkaczyk@piwet.pulawy.pl](mailto:angelika.tkaczyk@piwet.pulawy.pl)

# Wpływ leczenia niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na ekspresję wybranych genów u krów chorych na podkliniczne *endometritis*\*

D. Tobolski<sup>1,2</sup>, W. Barański<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Zapalenie błony śluzowej macicy jest jedną z najczęściej występujących chorób okresu poporodowego u krów ras mlecznych. Podkliniczna forma zapalenia błony śluzowej macicy (SE) nie może zostać zdiagnozowana na podstawie objawów klinicznych. Jedyną możliwą metodą zdiagnozowania SE jest pobranie wymazu cytologicznego błony śluzowej macicy oraz ocena procentowego udziału neutrofilów w stosunku do komórek *epithelium*. Stwierdzono, że już 5% udział neutrofilów w rozmazie wpływa negatywnie na wskaźniki rozrodcze. Występowanie SE w stadach krów mlecznych obejmuje od 20 do 40 %.

Badanie ma na celu poznanie wpływu leczenia niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na ekspresję: IL1 $\beta$ - Interleukiny  $\beta$ , IL6- Interleukiny 6, CXCL8- Interleukiny 8, IL17A- Interleukiny 17A, PTGDS- Syntazy prostaglandyny D, PTGS1- Cyklooksygenazy 1, PTGS2- Cyklooksygenazy 2, PTGES- Syntazy prostaglandyny E, PRXL2B- Syntazy prostaglandyny F, INHBA- Podjednostki  $\beta$  A inhibiny, INHA- Podjednostki  $\alpha$  inhibiny, FST- Folistatyny, POSTN- Periostyny w błonie śluzowej macicy

W celu zdiagnozowania zwierząt chorych na SE przebadano 289 krów mlecznych. Zwierzęta zakwalifikowane jako chore na SE i nie wykazujące innych schorzeń zostały losowo przypisane do trzech grup liczących po 9 osobników: leczonych ketoprofenem, leczonych meloksykamem oraz dostających placebo w postaci roztworu soli fizjologicznej. Czwartą grupę stanowiło 11 zdrowych krów. Leczenie zostało przeprowadzone po diagnozie choroby w 4 tygodniu po porodzie (pp). Ekspresja genów została przeprowadzona na podstawie próbek biopsyjnych pobranych w 4 oraz 6 tygodniu pp. Krowy biorące udział w doświadczeniu były badane co 30 dni do stwierdzenia ciąży lub brakowania. Po 14 dniach od leczenia w grupie leczonej ketoprofenem stwierdzono wzrost ekspresji IL6 oraz PTGS1 ( $p<0,1$ ). W grupie leczonej meloksykamem ekspresja INHA wzrosła po 14 dniach ( $p<0,1$ ). W grupie placebo nie zanotowano zmian w ekspresji. Zwierzęta zdrowe charakteryzowały się istotnym wzrostem ekspresji INHA, INHBA, PTGES w stosunku do pierwszej biopsji ( $p<0,05$ ). Nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji IL1 $\beta$ , CXCL8, IL17A, PTGDS, PRXL2B, FST w żadnej z badanych grup. Krowy z grupy zdrowej miały istotnie niższą ekspresję INHBA, POSTN, PTGS1, PTGES oraz wyższą PTGS2 i PRXL2B w 4 tygodniu pp ( $p<0,05$ ).

Przeprowadzone doświadczenie pokazuje brak istotnego wpływu podawania niesteroidowych leków przeciwzapalnych na ekspresję wyżej wymienionych genów w porównaniu do grupy placebo. Obniżona ekspresja PTGS2 u zwierząt chorych na SE może świadczyć o obniżonej zdolności układu immunologicznego do odpowiedzi immunologicznej w okresie poporodowym.

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

2 – email: [dawid.tobolski@student.uwm.edu.pl](mailto:dawid.tobolski@student.uwm.edu.pl)

## Foxn1 moduluje potencjał adipogeniczny śródkórnych komórek tłuszczowych (dWAT)\*

K.Walendzik<sup>1,2</sup>, J.Bukowska<sup>1</sup>, M.Kopcewicz<sup>1</sup>, B. Gawrońska-Kozak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Pracownia Biologii Regeneracyjnej, Zakład Biologicznych Funkcji Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

**Wstęp:** W skórze, czynnik transkrypcyjny Foxn1 reguluje fizjologiczną homeostazę naskórka oraz bierze udział w bliznowym gojeniu ran skórnych, podczas którego zaangażowany jest w procesy reepitelializacji i tranzycji naskórkowo – mezenchymalnej (EMT). Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że w procesie gojenia urazów skórnych aktywnie uczestniczą komórki tłuszczowe, określane jako śródkórne komórki tłuszczowe (dWAT). Znajdujące się w warstwie dermalnej skóry, komórki dWAT stymulują produkcję fibroblastów oraz zwiększają ich migrację do miejsca zranienia. Dotychczas wykazano, że sygnalizacja Wnt/ $\beta$ -katenina indukuje różnicowanie komórek progenitorowych skóry (preadipocyty, fibroblasty) do komórek tłuszczowych poprzez stymulację wydzielania ligandów szlaków sygnałowych białek morfogenetycznych kości (ang. BMP) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. IGF). Celem przedstawionych badań było określenie potencjalnego wpływu czynnika Foxn1 na proces adipogenezy w skórze niezranionej, jak i zranionej w kontekście wieku oraz diety, a także przedstawienie możliwej drogi sygnałowej związanej z tym procesem.

**Materiały i metody:** W serii doświadczeń *in vivo* wykorzystano transgeniczne myszy Foxn1::Egfp (Foxn1<sup>+/-</sup>) oraz myszy kontrolne C57BL/B6 (B6; Foxn1<sup>+/+</sup>). Myszy w wieku 2 i 18 miesięcy zostały podzielone na dwie grupy eksperymentalne karmione przez okres 8 tygodni: (1) dietą o niskiej zawartości tłuszczu (LFD) oraz (2) dietą o wysokiej zawartości tłuszczu (HFD). Następnie wykonano rany skórne, a pourazowe tkanki zebrano w dniach 3, 7, 14 oraz 21 po zranieniu. Tkanki wykorzystano do analiz ekspresji mRNA oraz białek, a także do barwień immunohistochemicznych oraz analizy cytometrycznej.

**Wyniki:** Myszy Foxn1<sup>+/-</sup> zarówno 2- jak i 18-miesięczne karmione HFD wykazały zdecydowanie mniejszy przyrost masy ciała w porównaniu do myszy kontrolnych. Analiza genów adipogenicznych (Ppar $\gamma$ , Fabp4 i Leptyny) w skórze myszy Foxn1<sup>+/+</sup> wykazała zależność poziomów ich ekspresji od wieku zwierząt oraz zastosowanej diety. Zaobserwowane różnice pokrywają się ze związanym z wiekiem spadkiem ekspresji Foxn1 u myszy Foxn1<sup>+/+</sup>. W przeciwieństwie, skóra niezraniona, jak i zraniona myszy o obniżonej ekspresji Foxn1 (Foxn1<sup>+/-</sup>) wykazała niższe, jakkolwiek niemodulowane wiekiem lub dietą poziomy Ppar $\gamma$ , Fabp4 i Leptyny. Analiza ekspresji genów szlaków proadipogenicznych: Bmp2 i Igf2 w niezranionej skórze myszy Foxn1<sup>+/+</sup>, Foxn1<sup>+/-</sup> i Foxn1<sup>-/-</sup> wykazała stopniowy spadek poziomów ich mRNA skorelowany ze stopniową inaktywacją Foxn1. Najwyższe poziomy ekspresji mRNA dla Bmp2 i Igf2 obserwowano w skórze grupy Foxn1<sup>+/+</sup>, pośrednie u Foxn1<sup>+/-</sup>, a najniższe u Foxn1<sup>-/-</sup>. Związana z kolejnymi etapami gojenia (pourazowe dni 3, 7, 14, 21) modulacja profili Bmp2 i Igf2 w zranionej skórze myszy Foxn1<sup>+/+</sup> była zaburzona u myszy Foxn1<sup>+/-</sup>. Może to wskazywać na zależność ich ekspresji od aktywacji/inaktywacji Foxn1.

**Podsumowanie:** Otrzymane wyniki wskazują na: i) zależność między aktywnością/brakiem aktywności Foxn1 i ekspresją genów promujących adipogenezę, ii) modulującą rolę czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w regulacji dWAT, iii) udział Foxn1 w szlakach sygnalizacyjnych BMP2 oraz IGF2.

\* Badania finansowane w ramach grantu promotorskiego Nr UMO-KNOW2016/IRZiBŻ/PRO1/01/2 oraz Narodowego Centrum Nauki; Projekt OPUS 14 Nr. 2017/27/B/NZ5/02610  
2 – e-mail: [k.walendzik@pan.olsztyn.pl](mailto:k.walendzik@pan.olsztyn.pl)

## **Wpływ treningu i udziału w gonitwach na stężenie kortyzolu i surowiczego amyloidu A we krwi koni wyścigowych w trakcie pierwszego sezonu treningowego\***

O. Witkowska-Piłaszewicz<sup>1,4</sup>, M. Żmigrodzka<sup>1</sup>, M. Czopowicz<sup>2</sup>, A. Winnicka<sup>1</sup>, C. Carter<sup>3</sup>, J. Grzędzicka<sup>1</sup>, J. Sień<sup>1</sup>, A. Cywińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Patofizjologii Zwierząt, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Samodzielna Pracownia Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>3</sup>*Weterynaryjne Laboratorium Diagnostyczne, University of Kentucky, Stany Zjednoczone*

Wysiłek fizyczny podczas regularnych treningów i gonitw jest rodzajem stresu i może istotnie wpływać na dobrostan koni wyścigowych, zwłaszcza młodych niedoświadczonych zwierząt w pierwszym sezonie treningowym. Aktywność fizyczna i stres powodują wzrost poziomu kortyzolu we krwi, a jeśli taki stan się przedłuża, może zaburzać wiele procesów metabolicznych. .

Celem badania było określenie wpływu rodzaju i intensywności wysiłku (trening vs. wyścig) oraz liczby treningów w sezonie na stężenie kortyzolu i surowiczego amyloidu A we krwi obwodowej niedoświadczonych koni czystej krwi arabskiej w pierwszym sezonie treningowym.

Do badania zakwalifikowano 14 klinicznie zdrowych koni arabskich o umiarkowanym temperamencie w wieku 3 lat, obu płci (15% samców, 85% samic). Wszystkie konie przebywały w zbliżonych warunkach środowiskowych i trenowane były zgodnie z podobnymi protokołami. Materiał do badań stanowiła krew pobierana przez 7 miesięcy przed i po treningu w odstępach 30 dniowych oraz przed i po gonitwie podczas pierwszego sezonu treningowego. Stężenie kortyzolu określono testem immunoenzymatycznym ELISA (Cloud-Clone Corp., USA). Wykonano także pomiar stężenia surowiczego amyloidu A (SAA) przed wysiłkiem testem ELISA (Tridelta Development, Irlandia). Absorbancję mierzono za pomocą czytnika Multiscan Reader (Labsystem, Helsinki, Finlandia) przy użyciu oprogramowania Genesis V 3.00.

Po sesjach treningowych nie stwierdzono istotnego zwiększenia stężenia kortyzolu, ponadto stężenia spoczynkowe były podobne podczas całego sezonu treningowego, mimo rosnącego obciążenia fizycznego (wzrost prędkości i dystansu). Jednak po gonitwach stężenie kortyzolu w surowicy znacznie wzrastało po wyścigach ( $p < 0,001$ ). Stężenie SAA nie uległo zmianie w trakcie całego sezonu treningowego. .

Właściwa kondycja fizyczna ma kluczowe znaczenie dla sukcesu w wyścigach. Brak zmian w stężeniu SAA potwierdza dobry stan zdrowia oraz dobrą tolerancję wzrastających obciążeń treningowych. Pomiary stężenia kortyzolu we krwi obwodowej są uważane za dobry wskaźnik stresu, a pośrednio również dobrostanu koni, również użytkownych wyścigowo. Wykazano, że istotnym stresem, mogącym wpływać na dobrostan koni jest start w gonitwie, nie są nim natomiast sesje treningowe.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 oraz Grantu nr 2017/25/N/NZ6/02750 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

4 – e-mail: [olga.witkowska.pilaszewicz@gmail.com](mailto:olga.witkowska.pilaszewicz@gmail.com)

## Wykrywanie cirkowirusa świń typu 2 (PCV2) w różnych materiałach diagnostycznych \*

A. Woźniak<sup>1,2</sup>, D. Miłek<sup>1</sup>, T. Stadejek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

Cirkowirus świń typu 2 (porcine circovirus type 2, PCV2) jest szeroko rozpowszechniony w populacji trzody chlewnej. Wirus jest istotny dla zdrowia świń ze względu na rolę jaką odgrywa w etiologii wielu chorób. Szczepienia przeciw PCV2 stanowią ochronę przed objawami klinicznymi zakażeń, jednak niewiele wiadomo na temat ich wpływu na zakażenia subklinicznie i siewstwo wirusa.

Celem badań było porównanie wykrywalności PCV2 w surowicy, kale i płynie ustnym pobranym od świń oraz ocena przydatności diagnostycznej tych materiałów w rozpoznawaniu zakażeń PCV2 metodą real-time PCR.

Materiał został pobrany od świń z 26 polskich ferm (22 fermy stosujące szczepienia i 4 fermy nieszczepione przeciwko PCV2). Ogółem pobrano 1759 surowic, 1723 próbek kału i 374 próbek płynu ustnego od świń w wieku 3-21 tygodni życia. Przed ekstrakcją materiału genetycznego próbki pulowano po 4-6. Łącznie zbadano 359 pul surowic, 351 pul kału i 209 próbek płynu ustnego. Próbki przebadano testem real-time PCR w kierunku PCV2. Pule o Ct>37 uznawano za ujemne. Dodatkowo przeprowadzono analizę ilościową liczby kopii wirusa, stosując szereg rozcieńczeń plazmidu zawierającego fragment ORF2 PCV2. Analizę statystyczną danych przeprowadzono w programie GraphPad Prism 8. W celu porównania częstości wykrywania PCV2 w różnych materiałach diagnostycznych użyto testu Fishera. Do porównania log<sub>10</sub> liczby kopii PCV2 wykorzystano nieparametryczny test Mann-Whitney'a.

Wiremia PCV2 została wykryta w 17.6% pul surowic z ferm szczepionych przeciwko PCV2 i w 63.5% pul surowic z ferm nieszczepionych. Średni poziom wiremii wynosił 5.3±1.1 log<sub>10</sub> kopii/ml i 6.0±1.2 log<sub>10</sub> kopii/ml odpowiednio na fermach szczepionych i nieszczepionych. DNA PCV2 w kale wykryto w 32.4% i 84.6% pul próbek z odpowiednio ferm szczepionych i nieszczepionych. Liczba kopii PCV2 w ml zawiesiny kału wynosiła 4.8±0.8 log<sub>10</sub> (fermy szczepione) i 6.2±1.3 log<sub>10</sub> (fermy nieszczepione). PCV2 wykryto w 46.1% próbek płynu ustnego z ferm szczepionych i 64.5% z ferm nieszczepionych. Średnia liczba kopii na ml płynu ustnego na fermach szczepionych wynosiła 5.4±1.0 log<sub>10</sub>, natomiast na fermach nieszczepionych 6.8±1.3 log<sub>10</sub>.

Porównanie występowania i log<sub>10</sub> liczby kopii PCV2 w surowicach, próbkach kału i płynach ustnych wykazało istotne statystycznie różnice między fermami szczepionymi i nieszczepionymi przeciwko PCV2 ( $p<0.05$ ).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że szczepienie przeciwko PCV2 ogranicza wiremię i siewstwo wirusa z kałem, jednak pomiędzy fermami obserwuje się znaczne zróżnicowanie w tym zakresie. Zwierzęta, u których nie stwierdza się wirusa w surowicy, mogą siać PCV2 z kałem. Wyjaśnienie podłoża różnej skuteczności szczepień w ograniczaniu występowania i poziomu wiremii na fermach wymaga dalszych badań.

Płyn ustny może być rekomendowanym materiałem do monitorowania eliminacji PCV2 ze stad świń. Natomiast ocena wiremii wydaje się być najbardziej miarodajnym narzędziem do oceny skuteczności szczepień przeciwko PCV2.

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

2 – e-mail: [joz.aleksandra@gmail.com](mailto:joz.aleksandra@gmail.com)

**III SYMPOZJUM KNOW: „ZDROWE ZWIERZĘ – BEZPIECZNA  
ŻYWNOŚĆ”**

**oraz**

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

## **SESJA PLENARNA I**

## „Dzika” strona chorób zakaźnych

M. Larska<sup>1</sup>, M. Krzysiak<sup>2</sup>, J. Rola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*  
<sup>2</sup>*Białowiecki Park Narodowy*

W ostatnim dwudziestoleciu zainteresowanie nadzorem i monitorowaniem chorób zwierząt wolno żyjących wzrosło, co doprowadziło do ich włączenia w koncepcję „Jednego Zdrowia” (*One Health*), gdzie spotykają się zdrowie ludzi i zwierząt zamieszkujących to samo środowisko. Zmiany w środowisku, takie jak: rosnące zanieczyszczenie; zmiany klimatu; intensyfikacja hodowli zwierząt gospodarskich; globalizacja; wzrost zagęszczenia ludności i ich przemieszczania się między różnymi szerokościami geograficznymi prowadzą do antropopresji na populacje zwierząt dzikich i środowiska, co poprzez częstsze interakcje międzygatunkowe zwiększa ryzyko transmisji (*spill-over* i *spill-back*) chorób endemicznych, czy też pojawianie się nowych (*emerging*) patogenów. Występowanie chorób zakaźnych zwierząt wolno żyjących stanowi zagrożenie zarówno dla zdrowia publicznego, jak i dla bioróżnorodności, co może nadal pogłębiać zmiany w środowisku, którego również człowiek jest częścią. Konieczność interdyscyplinarnego podejścia do kontroli i zwalczania chorób wymaga współpracy różnych grup zawodowych takich jak lekarze weterynarii, epizootolog/epidemiolog, biostatystycy, hodowcy, ekolodzy, leśnicy oraz myśliwi.

Jednym z kluczowych elementów jest prowadzenie monitoringu biernego wśród zwierząt dzikich. Opiera się on na dochodzeniach epizootycznych przypadków zachorowań i/lub upadków polega na badaniach pośmiertnych (rzadziej obserwacji przyżyciowej poprzez np. fotopułapki) i umożliwia wczesne wykrycie zakażeń, szczególnie tych przebiegających z wysoką śmiertelnością. Skuteczność tych działań zależy jednak również od zaangażowania hodowców, leśników, czy nawet osób prywatnych mających możliwość stałej obserwacji zwierząt w stadach wolnych. W przyrodzie zwłoki nawet dużego zwierzęcia padają natychmiast ofiarą padlinożerców lub nie odnalezione w porę zaczynają się rozkładać. Dlatego też badanie sekcyjne jest jednym z cenniejszych w diagnostyce chorób, jednak jest często niekompletne w populacjach zwierząt wolno żyjących. Analiza sytuacji epizootycznej, kierunek rozprzestrzeniania się zakażeń, ustalenie korelacji i czynników ryzyka, czy ocena wcześniej wprowadzonych programów zwalczania wymaga prowadzenia monitoringu czynnego. Nadzór ten wymaga zebrania reprezentatywnej liczby próbek od zwierząt umożliwiającej, które mogą umożliwić ewentualną interwencję w razie wystąpienia zakażenia jest jednak bardziej kosztowny i przez to stosowany rzadziej. Do badań przeglądowych najczęściej wykorzystuje się badanie serologiczne tj. testy immunoenzymatyczny (ELISA), test neutralizacji wirusa, odczyn wiązania dopełniacza (OWD), czy test immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID). Testy serologiczne nie są jednak pozbawione wad, tzn. obecność przeciwciał nie mówi o momencie zakażenia (wyjątek badania par surowic w odstępie 2-3 tyg.), niska specyficzność badania (wykrywane będą również przeciwciała dla szczepów niechorobotwórczych) i gorsza czułość testów komercyjnych, które opracowane są dla gatunków zwierząt gospodarskich. Badanie mikrobiologiczne (testy izolacji wirusologicznej i bakteryjnej, wykrywanie materiału genetycznego patogenu tj. test polimerazy łańcuchowej - PCR, ELISA antygenowa) do badań populacyjnych wykorzystywane są rzadziej. Pozwalają co prawda na identyfikację patogenu, są jednak trudniejsze technicznie, istotna jest jakość próbki, ograniczone są czasem trwania zakażenia (bakteriemi, wirerii, siewstwa), a przy zakażeniach mieszanych mogą być problemy z interpretacją wyniku.

Zaprezentowane zostaną przykłady strategii stosowanych w zwalczaniu chorób zakaźnych i zaraźliwych u zwierząt wolno żyjących ( w tym gatunków chronionych) oraz aktualne zagrożenia, z którymi być może wkrótce będziemy musieli się zmierzyć w Polsce i Europie.

---

1 – e-mail: [m.larska@piwet.pulawy.pl](mailto:m.larska@piwet.pulawy.pl)

## ***Dirofilaria repens* - badanie interakcji pasożyt - żywiciel z wykorzystaniem nowo poznanych antygenów pasożyta uzyskanych metodami biologii molekularnej\***

M. Pękacz<sup>1,2</sup>, M. Wyszomleć<sup>1</sup>, E. Długosz<sup>1</sup>, M. Klockiewicz<sup>1</sup>, K. Zadroga<sup>1</sup>, K. Powążka<sup>2</sup>,  
A. Zawistowska<sup>2</sup>, M. Wiśniewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie.

<sup>2</sup> Instytut Parazytologii Witolda Stefańskiego, PAN, Warszawa

*Dirofilaria repens* jest nicieniem należącym do rodziny *Onchocercidae*, będącym pasożytem mięsożernych, w szczególności psów, jednakże wykazującym coraz większy potencjał zoonotyczny. W wyniku działalności człowieka oraz zmian klimatu nicienie zostały rozpowszechnione szczególnie w Środkowej oraz Wschodniej części Europy, w tym m.in. Polsce i wywołują chorobę określaną jako dirofilariozę podskórną. Obecnie mało wiadomo w zakresie molekularnych mechanizmów interakcji pasożyt - żywiciel. Podobnie ciągle borykamy się z brakiem testu diagnostycznego opartego na technikach serologicznych. Obecnie diagnostyka inwazji *D. repens* opiera się na wykrywaniu mikrofilarii krążących w krwiobiegu żywiciela wykonując przede wszystkim zmodyfikowaną metodę Knott'a lub reakcję multiplex PCR. Jednak użycie tych metod jest mocno ograniczone przez periodyczną obecność mikrofilarii w żywicielu. Zarówno w pierwszym, jak i w drugim przypadku pierwszym krokiem w pokonaniu tych trudności jest pozyskanie antygenów pasożytniczych. Jak w większości tego typu badań niemożliwe jest pozyskanie ich, w wystarczającej ilości, w sposób natywny. Stąd autorzy, próbując rozwiązać ten problem, zastosowali wiele technik biologii molekularnej: RT-PCR, RACE-PCR, dwukierunkową elektroforezę w warunkach denaturujących, sekwencjonowanie DNA i białek, konstrukcję biblioteki genetycznej oraz ekspresję wybranych cDNA w prokariotycznym pET i/lub eukariotycznym *Pichia pastoris* układzie ekspresyjnym oraz liczne analizy bioinformatyczne. Materiał wyjściowy stanowił RNA wyizolowany z mikrofilarii i dorosłych nicieni *D. repens* pozyskanych od zarażonych psów. Dzięki ich zastosowaniu otrzymano nowopoznane, nieopisane do tej pory rekombinowane antygeny *D. repens* (białka wydaliniczo – wydzielnicze, enzymy proteolityczne i inhibitory proteaz) oraz jeden, bakteryjny - symbionta badanego nicienia, bakterii z rodzaju *Wolbachia*, które pozwoliły na wstępną ocenę przydatności badanych białek w opracowaniu testu diagnostycznego opartego na technikach immunoenzymatycznych oraz wpływu antygenu bakteryjnego na modelowanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela w trakcie inwazji pasożyta.

---

\*Badania były przeprowadzone w ramach projektu KNOW: UMO – KNOW2017/SGGW/LAB2/02/8 (<sup>1</sup>) oraz NCBiR: LIDER IX 0106/L-9/2017 (<sup>2</sup>).

**SESJA I:**  
**INNOWACYJNE METODY DIAGNOSTYKI, PROFILAKTYKI**  
**I TERAPII CHOROÓB ZWIERZĄT I LUDZI**

**Opracowanie elektrochemicznej platformy nanokompozytowej przeznaczonej do zastosowania w biosensorach opartej na połączeniu dwóch różnych materiałów: poli (3,4-etylenodioksytiofenu) (PEDOT) oraz nanocząstek złota (AuNP) lub nanocząsteczek magnetycznych (MNP)\***

E. Mikula<sup>1</sup>, F. Mazzei<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Pracownia Bioelektroanalizy, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

<sup>2</sup> *Laboratorium Biosensorów, Wydział Chemii i Technologii Leków, Sapienza University of Rome*

Opracowano nową elektrochemiczną platformę nanokompozytową do biowykrywania opartą na elektropozycji poli (3,4-etylenodioksytiofenu) (PEDOT) i nanocząstek złota (AuNP); PEDOT i nanocząsteczek magnetycznych (MNP). Badania skupiły się na ocenie powierzchni zmodyfikowanych AuNP oraz MNP, jako potencjalnych przetworników do wykrywania stosowanych w rozwoju biosensorów. Zastosowanie tych nanomateriałów poprawiło wydajność elektrochemiczną czujników opartych o elektrody MWCNT zmodyfikowane PEDOT oraz PEDOT + AuNP, a także PEDOT i PEDOT + MNP analizując różnicę w wydajności elektrochemicznej.

Zastosowanie materiału nanokompozytowego z nanocząsteczkami złota oraz nanocząstkami magnetycznymi osadzonymi w elektropolimeryzowanym PEDOT na elektrodach MWCNT zwiększa czułość czujnika potwierdzoną przez wysokie wartości powierzchni elektroaktywnej względem czystej elektrody zmodyfikowanej tylko samym polimerem. To zachowanie jest potwierdzone również w przypadku biosensorów enzymatycznych uzyskanych dzięki zastosowaniu tych zmodyfikowanych elektrod jako przetwornika. Uzyskano dobre wyniki dotyczące głównych właściwości elektroanalitycznych biosensorów zawierających modyfikację PEDOT materiałem nanokompozytowy/mioglobina i/lub PQQ-GHD enzym w stosunku do tych samych biosensorów, ale zawierających tylko PEDOT bez nanocząsteczek. Wykazano, że zastosowane materiały nanokompozytowe w strukturze polimeru w określonym stężeniu stanowią dobrą matrycę do utrzymania aktywności katalitycznej enzymu, zapewniając zwiększony transfer elektronu między centrum redoks enzymu, nanocząsteczkami i powierzchnią elektrody. Uzyskane wyniki sugerują potencjalne wykorzystanie tej platformy nanokompozytowej do opracowania zoptymalizowanych elektrochemicznych biosensorów opartych na transferze elektronów.

---

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

1 – e-mail: [e.mikula@pan.olsztyn.pl](mailto:e.mikula@pan.olsztyn.pl)

2 – e-mail: [franco.mazzei@uniroma1.it](mailto:franco.mazzei@uniroma1.it)

# **Zastosowanie technologii xMAP do jednoczesnego wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu\***

A. Pikula<sup>1,2</sup>, P. Kubiś<sup>3</sup>, K. Śmietanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

<sup>3</sup>*Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach*

Wirusowe choroby układu oddechowego są głównymi przyczynami strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim na całym świecie, co wynika głównie ze zwiększonej śmiertelności, różnicowaniu się stada oraz zmniejszonej produkcji jaj i mięsa. Etiologia tych chorób jest złożona i często obejmuje więcej niż jeden patogen. Wśród wirusów o największym znaczeniu wymieniane są wirus grypy ptaków (AIV) oraz wirus rzekomego pomoru drobiu (NDV). Celem prezentowanych badań było uzyskanie białek rekombinowanych obu tych patogenów, które docelowo miały być wykorzystane do opracowania multiplex ELISA w technologii Luminex xMAP. Metoda ta stanowi nowatorskie narzędzie diagnostyczne, gdyż pozwala na jednoczesne wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko różnym patogenom w pojedynczym badaniu.

W badaniach podjęto próbę pozyskania białek rekombinowanych hemaglutyniny podtypu H5 i H7 AIV oraz białek nukleoproteiny wirusów grypy ptaków oraz rzekomego pomoru drobiu. Do uzyskania białek rekombinowanych został zastosowany bakteryjny system klonowania i ekspresji genów aLICator LIC. Umożliwia on szybkie, wydajne i niezależne od ligacji klonowanie fragmentów DNA i ich kontrolowaną ekspresję w *E. coli*. Do klonowania genów i wytwarzania białek został użyty wektor pLATE52 oraz szczepy *E. coli* BL21 (DE3), w których ekspresja genu T7 polimerazy RNA jest kontrolowana przez indukowalny promotor *lacUV5*. Dzięki zawartej w wektorze sekwencji kodującej sześć histydyn (6 × His-tag), przed miejscem ukierunkowanego klonowania, uzyskane białka oczyszczano przy pomocy chromatografii metalopowinowactwa.

---

\* Badania finansowane z projektów badawczych nr UMO-KNOW2018/PIWet-PIB/MN1/01/2 oraz nr UMO-KNOW2018/PIWet-PIB/LAB2/02/09 przyznanych przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”

2 – e-mail: [anna.pikula@piwet.pulawy.pl](mailto:anna.pikula@piwet.pulawy.pl)

## **Zmiana potencjału analgetycznego morfiny wywołana premedykacją etanolem u myszy selekcyjonowanych w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej\***

Piotr Poznański<sup>1</sup>, Anna Leśniak<sup>2</sup>, Mariusz Sacharczuk<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Genomiki i Bioróżnorodności, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Magdalenka, Polska*

<sup>2</sup>*Zakład Farmakodynamiki i Patofizjologii, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska*

<sup>3</sup>*Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego I Angiologii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska*

Problem wystąpienia bólu opornego na morfinę dotyczy około 10% przypadków w praktyce klinicznej. Obecne postępowanie w uśmierzaniu tego rodzaju bólu polega na zwiększaniu dawki stosowanego opioidu, bądź całkowitej zmianie terapii.

W przedstawionym doświadczeniu zastosowano unikalny myszy model badawczy selekcyjonowany w kierunku wysokiej (HA) i niskiej (LA) analgezji postresowej. Głównymi cechami różnicującymi obie linie myszy są stan funkcjonalny bariery krew-mózg (BBB) oraz endogenna aktywność układu opioidowego. W przeciwieństwie do myszy linii HA, osobniki linii LA odznaczają się dysfunkcją układu opioidowego oraz wysoce selektywną BBB. Z uwagi na obecność cech różnicujących myszy obu linii, stanowią one doskonały model w badaniach nad odczuwaniem oraz łagodzeniem odczuwania bólu. Celem przedstawionych badań było zbadanie wpływu premedykacji roztworem etanolu na potencjał analgetyczny morfiny.

Analiza wyników otrzymanych w doświadczeniu wykazała, że wcześniejsze podanie etanolu istotnie zwiększa potencjał analgetyczny morfiny u myszy obu linii. Efekt ten jest bardziej widoczny w przypadku odruchów warunkowanych rdzeniowo. Istotniejszą obserwacją jest to, iż premedykacja etanolem powoduje również zwiększenie oddziaływania przeciwbólowego morfiny u osobników z hypoaktywnym układem opioidowym. Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano dwa mechanizmy, dotyczące modyfikacji przepuszczalności BBB przez etanol oraz oddziaływania etanolu na strukturę receptorów opioidowych, wyjaśniające zwiększenie potencjału analgetycznego morfiny po podaniu etanolu.

**Słowa kluczowe:** morfina, etanol, układ opioidowy, analgezja postresowa, naltrekson

---

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr KNOW2015/CB/PRO1/40).

e-mail: [p.poznanski@ighz.pl](mailto:p.poznanski@ighz.pl), [m.sacharczuk@ighz.pl](mailto:m.sacharczuk@ighz.pl)

# **Opracowanie bazy danych dla alkaloidów pirolizydynowych przy wykorzystaniu wysokorozdzielczego spektrometru mas Q-Exactive (Orbitrap) sprzężonego z UHPLC\***

E. Kowalczyk<sup>1,3</sup>, P. Mulder<sup>2</sup>, K. Kwiatek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Higieny Pasz*

<sup>2</sup>*Wageningen Food Safety Research, Wageningen University & Research, Holandia*

Grupa związków jaką są alkaloidy pirolizydynowe (AP) dzięki ogromnej różnorodności struktur chemicznych, globalnemu rozpowszechnieniu, a zwłaszcza ich szczególnemu znaczeniu jeśli chodzi o zagrożenie jakie stanowią dla ludzi i zwierząt sprawia, że są one niezwykle interesującą grupą substancji do badań z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru mas.

Szacuje się, że ponad 6000 gatunków roślin, co stanowi ok 3% wszystkich roślin kwitnących, wytwarza te wtórne metabolity. W ostatnich latach związki te zyskały szczególną uwagę, głównie ze względu na ich toksyczne właściwości, które mogą negatywnie wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt. Alkaloidy te mogą wykazywać właściwości silnie hepatotoksyczne, genotoksyczne, neurotoksyczne oraz kancerogenne. Ze względu na duże rozpowszechnienie roślin produkujących te związki, bardzo często dochodzi do zanieczyszczenia nimi pasz i żywności. Obecność AP była stwierdzana w paszach, zbożach, miodzie, herbatach, a także w żywności pochodzenia zwierzęcego takiej jak jaja, mleko czy mięso.

Do oznaczenia AP w paszach i żywności wykorzystywane są głównie metody oparte na technice LC-MS/MS. Jednakże znacznym ograniczeniem tej techniki jest jej zależność od dostępności wzorców analitycznych. Związki, dla których nie ma standardów analitycznych, przez co nie mogły być uwzględnione w metodzie, nie zostaną wykryte, a ostateczna zawartość alkaloidów może być znacznie niedoszacowana. W odróżnieniu, chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas pracującym w trybie pełnego wysokorozdzielczego skanowania nie posiada takich ograniczeń. Spektrometria mas wysokiej rozdzielczości daje olbrzymie możliwości szybkiego skringingu próbek w kierunku obecności szerokiej gamy toksyn roślinnych. Jednakże, aby otrzymać w pełni wiarygodną identyfikację związków wymagana jest kompleksowa baza danych zawierająca szczegółowe informacje spektralne.

Celem prowadzonych badań było opracowanie szerokiej bazy danych dla alkaloidów pirolizydynowych zawierającej takie informacje jak nazwa, skład pierwiastkowy, dokładna masa, czas retencji, oraz dokładne masy charakterystycznych jonów fragmentacyjnych. W celu uzyskania pożądaných informacji, analizie poddano 65 standardów analitycznych jak również ponad 200 ekstraktów uzyskanych z roślin wytwarzających AP.

Analiza standardów analitycznych pozwoliła na zidentyfikowanie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych typowych dla poszczególnych rodzajów AP: monoestrów, diestrów, makrocyclicznych diestrów oraz ich N-tlenków, jak również dla związków należących do typu otonecynowego i platynecynowego. Do badań wykorzystano Q-Exactive (Orbitrap) MS sprzężony z UHPLC. Badanie wykonywano w trybie pełnego skanowania jak również z zastosowaniem trybu DDA- data independent acquisition.

Identyfikacja charakterystycznych fragmentów oraz określenie ich dokładnej masy pozwoliły na opracowanie metody skringingowej umożliwiającej łatwe i efektywne wyszukiwanie związków potencjalnie należących do grupy alkaloidów pirolizydynowych w badanych ekstraktach. W rezultacie, zidentyfikowano kilkaset związków i umieszczono je w opracowywanej bazie danych wraz z wszystkimi wymaganymi informacjami spektralnymi. Opracowana baza danych posłuży do identyfikacji alkaloidów pirolizydynowych w próbkach pasz i żywności badanych z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru mas.

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

3 - e-mail: ewelina.kowalczyk@piwet.pulawy.pl

# Wstępne wyniki opracowania i optymalizacji metody loop-mediated isothermal amplification (LAMP) do wykrywania *Mycoplasma bovis* u bydła\*

E. Szacawa<sup>1,3</sup>, K. Dudek<sup>1</sup>, G. Woźniakowski<sup>2</sup>, D. Bednarek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

<sup>2</sup>Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

**Wstęp.** *Mycoplasma (M) bovis* to bakteria powodująca m. in. choroby układu oddechowego, zapalenie wymion i stawów oraz zapalenie rogówki i spojówki u bydła. Zakażenia *M. bovis* stanowią częsty problem hodowców niemal na całym świecie. Objawy kliniczne nie są patognomoniczne, dlatego też zakażenie tym patogenem można wykryć jedynie poprzez zastosowanie w diagnostyce kombinacji kilku metod badawczych, najlepiej ELISA połączonej z odpowiednio dobranymi metodami molekularnymi.

**Materiał i metody.** Opracowano metodę LAMP (loop-mediated isothermal amplification) służącą do wykrywania materiału genetycznego *M. bovis*. Metoda ta polega na amplifikacji materiału genetycznego w stałej temperaturze i szybkim czasie. Zaprojektowano sześć starterów (FIP, BIP, F3, B3, Loop F i Loop B) za pomocą oprogramowania Primer explorer V5 w oparciu o region *oppD/F M. bovis*, genu kodującego permeazę oligopeptydów. Mieszanina reakcyjna składała się ze starterów, odczynnika do przeprowadzania reakcji w warunkach izotermalnych, wody oraz DNA matrycowego lub próbki kontrolnej ujemnej. W celu optymalizacji testowano różne ilości i stężenia odczynników w różnych temp. i czasie w bloku grzejnym. Wynik dodatni reakcji stanowiła fluorescencja mieszaniny reakcyjnej w świetle dziennym oraz w świetle UV po uprzednim dodaniu do niej odczynnika SybrGreen. Specyficzność została określona poprzez badanie szczepu wzorcowego *M. bovis* ATCC (25523), 21 izolatów *M. bovis*, 10 innych gatunków *Mycoplasma* oraz 7 innych niż mykoplazmy gatunków bakterii. Czułość określono przez badanie 10-krotnych rozcieńczeń DNA.

**Wyniki.** Otrzymano dodatnie wyniki reakcji dla szczepu wzorcowego *M. bovis* i wszystkich badanych izolatów *M. bovis* a wyniki ujemne dla innych gatunków *Mycoplasma*, innych niż mykoplazmy gatunków bakterii oraz dla ujemnych próbek kontrolnych. Przeprowadzona dodatkowo elektroforeza produktów reakcji oraz badanie fluorescencji na aparacie do real-time PCR potwierdza, że fluorescencję otrzymano w przypadku obecności materiału genetycznego *M. bovis*. Jednak badanie wymaga dalszej optymalizacji ponieważ wskazuje fluorescencję w świetle dziennym oraz UV dla jednego, innego niż *Mycoplasma* gatunku bakterii, co nie ma potwierdzenia w postaci obecności materiału genetycznego w przeprowadzonej elektroforezie w żelu agarozowym oraz w badaniu fluorescencji w aparacie do real-time PCR. Czułość metody jest zadowalająca, optymalna temperatura reakcji LAMP wynosi 63°C a czas trwania 45-60 min.

**Podsumowanie.** Wstępne opracowanie i optymalizacja metody LAMP wykazały zadowalające wyniki czułości i specyficzności. Metoda wymaga jedynie dopracowania w kontekście niespecyficznej fluorescencji. LAMP może stać się alternatywą dla konwencjonalnego PCR w badaniu zakażeń *M. bovis* u bydła gdyż wynik badania można otrzymać znacznie szybciej w porównaniu do PCR lub real-time PCR. Ponadto metoda ta jest ekonomiczna ponieważ nie wymaga posiadania specjalistycznej, kosztownej aparatury badawczej.

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

3 – e-mail: ewelina.szacawa@piwet.pulawy.pl

# Wpływ uodporniania indyków przeciwko wirusowi krwotocznego zapalenia jelit na wybrane mechanizmy odpowiedzi komórkowej i humoralnej w warunkach dużej presji wirusa terenowego\*

B. Tykałowski<sup>1,2</sup>, A. Koncicki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie

Krwotoczne zapalenie jelit indyków (HE) pierwszy raz opisali Pomeroy i Fenstermacher w 1937 roku w USA. W Polsce po raz pierwszy HE u indyków rozpoznał i opisał Koncicki w 1987 roku. Polskie izolaty HEV mają zwykle niską patogenność wywołując chorobę o przebiegu subklinicznym. Niestety nawet mało zjadliwe szczepy tego wirusa należącego do rodzaju *Siadenovirus* rodziny *Adenoviridae* powodują silną immunosupresję prowadząc do wtórnych zakażeń bakteryjnych (*E. coli*, *O. rhinotracheale*, *B. avium*, *Clostridium spp.*) i ogromnych strat. Do tej pory mechanizm powstawania stanu immunosupresji u indyków zakażonych HEV nie został dokładnie wyjaśniony. Doświadczalnie potwierdzono wielokierunkowe oddziaływanie wirusa na komórki układu immunologicznego. Pomiedzy 4-6 dobą po zakażeniu wirus HE powoduje w śledzionie i krwi obwodowej spadek odsetka limfocytów B. Ponadto dochodzi do silnego wzrostu odsetka limfocytów T pomocniczych (CD4<sup>+</sup>) w śledzionie u zakażonych HEV indyków. W tym czasie odsetek subpopulacji limfocytów T cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>) we krwi i w śledzionie ulega silnemu spadkowi.

Mając na uwadze wyżej opisane obserwacje postanowiono przeprowadzić badania własne nad wpływem uodporniania indyków przeciwko HEV na wybrane wskaźniki odporności w przebiegu zakażenia eksperymentalnego tym wirusem. Doświadczenie przeprowadzono na czterech grupach indyków. Ptaki z grup I i II zaszczepiono przeciwko HE w 28 dobie życia szczepionką Dindoral SPF (Boehringer). W 42 dobie życia ptaki z grup I i III zakażono per os terenowym izolatem HEV. Indyki z grupy IV stanowiły nieszczepioną i niezakażoną kontrolę. Oznaczono metodą cytometrii przepływowej odsetek subpopulacji limfocytów CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i IgM<sup>+</sup> we krwi, śledzionie i migdałkach jelit ślepych u indyków po 3, 7, i 14 dniach od zakażenia. Metodą qPCR oznaczono ekspresję genu kodującego IFN-γ w splenocytach oraz liczbę kopii fragmentu genu kodującego główne białko kapsydu (Hexon) wirusa krwotocznego zapalenia jelit w śledzionach indyków. Ponadto techniką ELISPOT określono we krwi liczbę limfocytów T swoiście uczulonych w stosunku do HEV a metodą ELISA miano przeciwciał poszczepiennych w surowicy.

HEV powoduje istotny spadek odsetka komórek B i limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz wzrost odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> w śledzionie i CTs w 3 i 7 d.p.i. Szczepienie istotnie hamuje replikację HEV w śledzionie powodując wzrost ekspresji genu kodującego IFN-γ w splenocytach, miana przeciwciał anti-HEV w surowicy oraz liczby komórek T pamięci immunologicznej we krwi.

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

2 – e-mail: [bartlomiej.tykalowski@uwm.edu.pl](mailto:bartlomiej.tykalowski@uwm.edu.pl)

## **SESJA PLENARNA II**

## **Badania ultrastruktury komórek, tkanek i narządów w układzie trójwymiarowym oraz w powiązaniu z obrazem z mikroskopii fluorescencyjnej**

B. Lewczuk

*Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

Jednym z najistotniejszych ograniczeń transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) jest brak możliwości obrazowania dużych próbek biologicznych. Wprowadzenie zmotoryzowanych stolików preparatowych i kamer cyfrowych z matrycami o wymiarach 6 x 6 cm i większych do TEM otworzyło drogę do obrazowania znacznie większych niż wcześniej pól widzenia i badania skrawków seryjnych. Jednakże analiza skrawków seryjnych w TEM jest bardzo czasochłonna, ponadto istnieją duże ryzyko deformacji i uszkodzenia skrawków. Rozwój techniki detekcji elektronów wstecznie rozproszonych (BSE) w skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i wprowadzenie nowych protokołów przygotowania próbek biologicznych stworzyły możliwość obrazowania ultrastruktury grubych próbek, nieprzepuszczalnych dla wiązki elektronów. Otworzyło to drogę do opracowania alternatywnych metod badań ultrastrukturalnych, które upraszczają i przyspieszają analizę dużych objętości próbek biologicznych oraz umożliwiają rekonstrukcję struktury trójwymiarowej (3D) komórek, tkanek i narządów. Jedną z tych metod jest technika określana angielskim terminem „Serial Block Face Imaging” (SBFI), w której obrazy ultrastrukturalne są rejestrowane z powierzchni próbki w sposób seryjny, każdorazowo bezpośrednio po usunięciu warstwy materiału za pomocą noża diamentowego. Cięcie jest wykonywane automatycznie w komorze mikroskopu skaningowego, preparat porusza się w osi z, ale pozostaje nieruchomy w osiach x i y, co zapewnia uzyskanie wyrównanego stosu obrazów. Następną metodą, opartą o bardzo podobną ideę, wykorzystuje skupioną wiązkę jonów (Focus Ion Beam SEM, FIB-SEM) do ablacji materiału z powierzchni preparatu. Po usunięciu warstwy materiału, wykonywana jest rejestracja obrazu z odsłoniętej powierzchni i cykl jest powtarzany. Główną zaletą FIB SEM w porównaniu do SBFI jest poprawa rozdzielczości w osi z. Jednakże, usuwanie materiału za pomocą skupionej wiązki jonów jest znacznie wolniejsze w porównaniu do cięcia przy użyciu noża diamentowego, co sprawia że objętości analizowane za pomocą FIB SEM są istotnie mniejsze niż przy użyciu SBFI. W obu metodach warstwa preparatu ulega zniszczeniu po obrazowaniu. Alternatywną metodą dla SBFI, w której skrawki nie są niszczone, jest tomografia szeregu skrawków seryjnych (Array Tomography). Ultracienkie skrawki seryjne są zbierane na podłożach stałych, takich jak szkło lub krzem, z których obrazy są rejestrowane za pomocą detektorów BSE. Automatyczne zbieranie skrawków seryjnych na taśmie jest możliwe za pomocą specjalnego ultramikrotomu (ATUM). W celu przyspieszenia obrazowania bardzo dużej ilości skrawków (często liczonych w tysiącach) opracowano wielowiązkowy mikroskop elektronowy, który obrazuje równocześnie za pomocą nawet 91 wiązek elektronów. Skrawki seryjne mogą być również wykorzystywane do obrazowania w mikroskopie fluorescencyjnym. Pozwala to na korelację obrazów z mikroskopu świetlnego i elektronowego, i tym samym powiązanie danych o występowaniu określonych substancji w komórkach i tkankach z ich ultrastrukturą. Wprowadzenie powyższych metod do warsztatu badań biologicznych związane było i wciąż jest z rozwiązywaniem wielu problemów. Konieczne było opracowanie protokołów zapewniających uzyskanie wysokiego kontrastu badanych elementów w bločku, otrzymanie blozków odpornych na strumień elektronów, wyeliminowanie problemu elektryzowania się materiału, czy wreszcie opracowanie procedur zdolnych pogodzić techniki immunofluorescencji z kontrastowaniem z użyciem metali ciężkich. Aktualnie największym ograniczeniem badań 3D ultrastruktury jest przygotowanie rekonstrukcji przestrzennych ze stosu obrazów zebranych w osi z, co wymaga ręcznego wyboru elementów i jest niezwykle pracochłonne. Metody badania ultrastruktury 3D zostały opracowane przede wszystkim z myślą o badaniach neuroanatomicznych, w tym realizacji projektu opracowania mapy połączeń synaptycznych mózgu. Obecnie są one stosowane w badaniach wielu rodzajów komórek i tkanek, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych.

## Regulacja genu dla Prdm3 (PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing 3) w trakcie neurogenezy i ponadto\*

P. Leszczyński<sup>1</sup>, M. Śmiech<sup>1</sup>, A. S. Teeli<sup>1</sup>, H. Taniguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorium Edycji Genomu i Regulacji Transkrypcji, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk*

Białka Prdm są grupą słabo poznanych czynników, które istotnie oddziałują na procesy komórkowe. Szczególnie interesujące wydaje się być białko Prdm3. Jest to gen homologiczny dla genu Hamlet u *Drosophila melanogaster* oraz egl-43 u *Caenorhabditis elegans*. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że białko Hamlet modyfikuje odpowiedź komórkową, oddziałując na ścieżkę sygnalizacyjną Notch. W czasie kształtowania się morfologii komórek neuronów receptorowych węchu u *Drosophila melanogaster* zaobserwowano, że białka Hamlet są odpowiedzialne za "wymazanie stanu informacji", jakie komórka nabyła poprzez mechanizmy zależne od ścieżki Notch. Zjawisko to pozwala komórce potomnej zmienić swój kierunek różnicowania w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne. Rola Prdm3 w procesie neurogenezy ssaków nie jest wciąż znana. Wiadomo, że poziom ekspresji Prdm3 w trakcie rozwoju komórek neuronalnych gwałtownie rośnie, lecz jego potencjalne cele molekularne pozostają niezidentyfikowane. W naszych badaniach postanowiliśmy określić potencjalne mechanizmy regulujące aktywność promotora dla genu Prdm3 w procesie neurogenezy (model neurogenezy *in vitro* bazujący na różnicowaniu neuronalnym mysich komórek linii P19). Skupiliśmy się na dwóch grupach czynników, mających fundamentalne znaczenie dla rozwoju organizmu: białka z rodziny Gata oraz kwas retinowy. Funkcje czynników transkrypcyjnych Gata są dobrze rozpoznane w procesie kształtowania się narządów pochodzenia endodermalnego, lecz ich wpływ na rozwój układu nerwowego jest bardzo słabo przebadany. Nasze analizy wskazują nie tylko, że poziom ekspresji dla genów Gata zmienia się w trakcie neurogenezy, lecz również ich nadekspresja zwiększa aktywność promotora dla genu Prdm3. Kwas retinowy, jako newralgiczny czynnik w procesie rozwoju neuronów również pozytywnie wpływa na poziom ekspresji Prdm3. Ostatecznie, nasze eksperymenty dowodzą, że nadekspresja Gata oraz stymulacja zależna od kwasu retinowego ma synergistyczny efekt w stosunku do aktywności promotora dla genu Prdm3. Badania te przybliżają nas do określenia potencjalnej roli białka Prdm3 w procesie różnicowania neuronalnego.

---

\*Badania były finansowe ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, Preludium 13, nr grantu UMO-2017/25/N/NZ3/ 01886) oraz ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

e-mail: [p.leszczynski@ighz.pl](mailto:p.leszczynski@ighz.pl)

**SESJA II:  
BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE ZWIERZĄT GOSPODARSKICH,  
WOLNO ŻYJĄCYCH ORAZ ŚRODOWISKA**

## Fotoperiod jako czynnik modulujący wpływ endotoksyny bakteryjnej i leptyny na ekspresję genów cytokin prozapalnych i ich receptorów w przedniej części przysadki owcy\*

M. Wójcik<sup>1,2</sup>, A. Krawczyńska<sup>1</sup>, M. Tomczyk<sup>1</sup>, K. Biernacka<sup>1</sup>, A. P. Herman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk*

Leptyna to adipokina o plejotropowym działaniu syntezowana głównie w białej tkance tłuszczowej. W stanie fizjologicznym, głównym przetwornikiem sygnału leptyny jest podwzgórze, gdzie oddziałuje indukując sygnał anoreksygeny. Jednakże w warunkach patologicznych, np. w otyłości, stwierdza się występowanie oporności tkanek i narządów na działanie tego „hormonu sytości”. Podobny mechanizm zaobserwowano u zwierząt fotoperiodycznych, np. owiec, które w warunkach dnia długiego wykazują fizjologiczną oporność na działanie tej adipokiny. Wynika to najprawdopodobniej z potrzeby gromadzenia przez te zwierzęta rezerw energetycznych w okresie o dużej dostępności pokarmu. Leptyna jest również istotnym czynnikiem modulującym aktywność układu odpornościowego i przebieg reakcji zapalnej. Stwierdzono, że w sposób dawko-zależny wpływa na produkcję prozapalnych cytokin, takich jak interleukina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 czy czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Z kolei cytokiny te mogą zaburzać aktywność sekrecyjną gruczołów endokrynych, w tym przedniej części przysadki. Warto zaznaczyć, że cytokiny docierają do przysadki nie tylko z krwią obwodową, ale są także bezpośrednio syntetyzowane przez komórki tego gruczołu działając tym samym w sposób auto- i parakryny. Bezpośrednie oddziaływanie cytokin zapalnych i leptyny na aktywność sekrecyjną przysadki jest możliwe dzięki ekspresji receptorów tych białek w jej komórkach. Ponieważ w badaniach na komórkach układu immunologicznego wykazano, że leptyna może wpływać zarówno na syntezę cytokin zapalnych, jak również na ekspresję ich receptorów, można założyć że również w przysadce w czasie stanu zapalnego takowy wpływ leptyny będzie obserwowany.

Celem badań było określenie wpływu fotoperiodu na działanie leptyny na ekspresję genów kodujących IL-1, TNF $\alpha$  i IL-6 oraz ich receptory w komórkach przedniego płata przysadki u owiec w stanie fizjologicznym, jak również w ostrym stanie zapalnym.

Doświadczenia przeprowadzono na 48 owcach rasy czarnogłówka w dwóch okresach o różnej długości dnia. W obrębie każdego doświadczenia zwierzęta podzielono na 4 grupy: kontrola (iniekcja NaCl), lipopolisacharyd (LPS; 400 ng/kg masy ciała); leptyna (20 ng/kg masy ciała) oraz LPS+leptyna (iniekcja LPS 30 minut przed podaniem leptyny). Po 3 godzinach od podania LPS owce zostały poddane eutanazji w celu pobrania fragmentów przedniej części przysadki. W pobranych tkankach przeprowadzono analizę względnej ekspresji genów cytokin prozapalnych oraz ich receptorów. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu wieloczynnikowej analizy wariancji oraz testu post-hoc Fishera. W okresie dnia długiego obserwowano wyższy poziom ekspresji *IL1R2*, *TNF*, *TNFRSF1A* i *TNFRSF1B*. Niezależnie od warunków fotoperiodycznych podanie LPS spowodowało wzrost ekspresji *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6*, *IL6R*, *IL6ST*, *TNFRSF1B* oraz *TNFRSF1A*, natomiast wzrost ekspresji *IL1B* obserwowany był jedynie w okresie dnia krótkiego. W grupach otrzymujących leptynę stwierdzono wzrost ekspresji *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6R*, *IL6ST*, *TNF* i *TNFRSF1B* jedynie w okresie dnia krótkiego. W grupie LPS+leptyna stwierdzono wzrost ekspresji wszystkich badanych genów w odniesieniu do grupy kontrolnej w obu fotoperiodach, natomiast w odniesieniu do grupy LPS zaobserwowano wzrost ekspresji *IL1B*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6*, *TNF* i *TNFRSF1B* i spadek *IL6ST* w okresie dnia krótkiego.

Przeprowadzone badania wykazały, że fotoperiod wpływa na ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne i ich receptory w przedniej części przysadki oraz na oddziaływanie leptyny na ekspresję tych genów. Otrzymane wyniki sugerują również zróżnicowany fotoperiodem wpływ leptyny na przebieg stanu zapalnego w przysadce, a tym samym można przypuszczać, że również na aktywność sekrecyjną tego gruczołu.

\* Badania finansowane z grantu NCN SONATA 6 nr 2013/11/D/NZ9/02536 (doświadczenie na zwierzętach) oraz ze statutu IFiZZ PAN (oznaczenie ekspresji genów).

2 – e-mail: [m.wojcik@ifzz.pl](mailto:m.wojcik@ifzz.pl)

Miód pitny to fermentowany napój alkoholowy na bazie miodu. W związku z zastosowaniem w produkcji zróżnicowanego stosunku miodu do wody, wyróżnia się: półtoraki, dwójniaki, trójniaki i czwórniaki. Pod względem technologicznym miody pitne dzieli się na „sycone” i „niesycone”. W „syconych” proces fermentacji poprzedzony jest gotowaniem brzezki, a brzezka „niesyconych” jest bezpośrednio poddawana fermentacji. Tym samym ilość miodu i przypraw, oraz parametry produkcji (fermentacja, podgrzewanie) mogą istotnie wpływać na profil związków aromatycznych i jakość sensoryczną miodów pitnych.

Materiał badawczy stanowiły polskie miody pitne „niesycone”: półtorak, dwójniak, trójniak, czwórniak oraz trójniak „sycony”. Związki lotne z prób miodów były ekstrahowane przy zastosowaniu aparatury SAFE, a następnie rozdzielane na chromatografie gazowym, i identyfikowane na detektorach FID oraz olfaktometrycznym (GC-O). Z kolei do ilościowego oznaczenia związków lotnych zastosowano mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME), a następnie analizowano przy pomocy chromatografu gazowego połączonego ze spektrometrem masowym (GC-MS). Dodatkowo wykonano analizę zapachu przez panel sensoryczny.

Celem przeprowadzonych badań było określenie profilu związków odpowiedzialnych za kształtowanie zapachu miodów pitnych oraz skorelowanie wyników analiz GC-O, GC-MS i oceny sensorycznej.

W zależności od rodzaju miodu pitnego podczas analizy GC-O scharakteryzowano 25- 39 związków lotnych. Zidentyfikowane związki to przede wszystkim estry kwasów tłuszczowych (produkty procesu fermentacji), posiadające charakterystyczny owocowy zapach, oraz związki o zapachu miodowym i przyprawowym. Trzy z tych związków (eugenol, kwas fenyllooctowy i 2-fenyletanol) występowały jako najbardziej zapachowo czynne we wszystkich badanych próbach. Natomiast analiza SPME-GC-MS wykazała, że dominującym ilościowo związkiem jest kapronian etylu. Ponadto oznaczono zawartości związków lotnych pochodzących od przypraw takich jak: 1,8-cineol, terpineol, eugenol oraz safrol. Ich skład był zróżnicowany ze względu na rodzaj mieszanki przypraw dodawanych w recepturze. W panelu sensorycznym zapach etanolowy był najwyżej ocenianym wyróżnikiem miodów pitnych. Kolejno aromat goździkowy, słodowy, słodki oraz miodowy. Najwyższą ocenę ogólną otrzymał miód pitny typu półtorak, któremu przypisywano najwyższy poziom zapachu słodkiego i miodowego. Uzyskane rezultaty wskazują na istotną rolę procesu fermentacji oraz dodawanych przypraw na kształtowanie zapachu miodów pitnych. Natomiast nie stwierdzono znaczącego wpływu podgrzania brzezki na aromat i ocenę sensoryczną.

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

3 – e-mail: [m.starowicz@pan.olsztyn.pl](mailto:m.starowicz@pan.olsztyn.pl)

## **Znaczenie izoform dehydrogenazy mleczanowej w nowotworzeniu\***

K. Urbańska<sup>1</sup>, A. Orzechowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

Wśród wielu hipotez wyjaśniających przyczyny nowotworzenia najczęściej wymienia się zmiany w genomie lub epigenomie komórki. Wraz z ukazaniem się artykułów autorstwa Otto Warburga stopniowo umacniało się przekonanie, że u podłoża nowotworzenia leżą zaburzenia procesów oddychania komórkowego, a wyniki wielu kolejnych badań pozwalają stwierdzić, że nowotwór może być uznany za chorobę metaboliczną (Seyfried i wsp., 2014).

Komórki nowotworowe charakteryzuje ograniczone wykorzystanie fosforylacji oksydacyjnej na rzecz fosforylacji substratowej w oddychaniu beztlenowym (glikolizie). Co więcej, w zależności od dostępności substratów komórki transformowane mogą zmieniać swój metabolizm i wykorzystywać różne szlaki oddychania komórkowego. Enzymami, które umożliwiają tę metaboliczną plastyczność są dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) i dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB). Obserwowany wzrost ekspresji LDHA w komórkach transformowanych nowotworowo w odpowiedzi na podwyższenie aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  w porównaniu do komórek prawidłowych sugeruje ważną rolę jaką pełni ten enzym w powstawaniu i rozwoju nowotworu. Bardziej złożony i mniej poznany wydaje się być udział LDHB w tych procesach (Urbańska i Orzechowski, 2019).

W prezentacji zostaną przedstawione informacje dotyczące udziału LDHA i LDHB w procesach nowotworzenia i zjawiskach wspierających rozwój guzów (prolifracja, apoptoza, autofagia, martwica, przerzutowanie). Omówiona zostanie także rola dehydrogenazy mleczanowej w regulacji odpowiedzi komórek układu immunologicznego oraz komórek podścieliska rosnącego guza.

### **Bibliografia:**

1. Seyfried T.N., Flores R.E., Poff A.M., D'Agostino D.P.: Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014 Mar; 35(3): 515–527.
2. Urbańska K., Orzechowski A.: Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 May; 20(9): 2085.

---

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

1 – e-mail: [kaja\\_urbanska@sggw.pl](mailto:kaja_urbanska@sggw.pl)

## Monitoring chemicznych pozostałości w wątrobie lisa rudego w Szkocji\*

M. Giergiel<sup>1,2</sup>, M. Taylor<sup>2</sup>, A. Giel<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>*Zakład Farmakologii i Toksykologii, Piwet-PIB w Puławach*

<sup>2</sup>*Department of Chemistry, SASA, Edynburg*

Zanieczyszczenie środowiska chemicznymi pozostałościami jest coraz bardziej powszechne. W celu monitorowania tego procesu wykorzystuje się zwierzęta wolno żyjące, które są dobrym bioindykatorem. Doskonałym przykładem takiego zwierzęcia jest lis rudy (*Vulpes vulpes*), który w Szkocji jest jednym z nielicznych drapieżników i jednocześnie padlinożercą. W związku z powyższym uznano za celowe zbadanie próbek pochodzących z wątrob lisów odstrzelonych w latach 2014-2019, na terenie Szkocji.

Próbki po ekstrakcji i oczyszczaniu metodą **QuEChERS** zostały przeanalizowane wieloskładnikową metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem mas LC-MS/MS, która obejmuje związki z grup rodentycydów hydroksykumarynowych, pestycydów i leków weterynaryjnych (172 substancji czynnych).

Podczas projektu przebadano ok. 120 próbek. W 68,64% próbek stwierdzono obecność pozostałości, natomiast 31,36% próbek było negatywnych. Wśród próbek dodatnich 82,6 % zawierały rodentycydy, 31,86% pestycydy, a 25,96% leki weterynaryjne. W znacznej części przebadanych próbek wykryto różne pozostałości (48,38%). Duża część próbek zawierała tylko rodentycydy (40,12%), natomiast w części próbek nie stwierdzono obecności rodentycydów (7,08%). Rodentycydy wykryte w próbkach to przede wszystkim bromadilon (94,3%), brodufakum (16,8%), difenakum (19,6%), ale również flokumafen (1,4%), kumatetralyl (0,7%) i difetialon (0,7%). Wśród pestycydów stwierdzono obecność następujących związków: spiroksaminy (7,41%), fenpropimorfu (3,7%) i flutriafołu (70,4%). Wśród leków weterynaryjnych wykryto obecność klosantelu (86,36%), levamizolu (3,7%) i oxyfendazolu (9,1%).

Uzyskane wyniki wskazują na obecność wykrytych substancji w środowisku co świadczy o jego dużym zanieczyszczeniu. Działalność człowieka oraz hodowla zwierząt wywiera coraz większy wpływ na środowisko naturalne oraz zwierzęta wolno żyjące. Dlatego też potrzebne są działania monitoringowe, aby kontrolować ten proces.

---

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (nr projektu K/01/7.8).

2 – e-mail: [marta.giergiel@piwet.pulawy.pl](mailto:marta.giergiel@piwet.pulawy.pl)

# Wpływ bisfenolu A na neurochemiczną charakterystykę włókien nerwowych zlokalizowanych w ścianie macicy świni domowej\*

L. Rytel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

Bisfenol A (BPA, dian, 2,2-bis(4-hydroksyfenylo) propan) jest organicznym związkiem chemicznym powszechnie używanym w przemyśle spożywczym do produkcji plastikowych pojemników na żywność. Dotychczasowe badania wykazały, że związek ten może wypłukiwać się z tworzyw sztucznych i z wodą bądź żywnością dostawać się do przewodu pokarmowego organizmów żywych. BPA może negatywnie wpływać na wiele układów i narządów wewnętrznych. Wiadomo, iż związek ten działa neurotoksycznie i kancerogennie, a także zaburza działanie układu rozrodczego, hormonalnego, pokarmowego, immunologicznego oraz sercowo-naczyniowego.

Jednakże wiele aspektów działania BPA pozostaje dotychczas niewyjaśnionych. Jednym z nich jest oddziaływanie tej substancji na unerwienie układu rozrodczego. Dlatego też tematem niniejszych badań było określenie wpływu niskich i wysokich dawek BPA na neurochemiczną charakterystykę współczulnych i przywspółczulnych włókien nerwowych zaopatrujących macicę świni domowej. Badania przeprowadzono przy pomocy metod immunofluorescencji pojedynczej i podwójnej na macicach pobranych od 15 niedojrzałych płciowo loszek podzielonych na trzy grupy: 1) grupę kontrolną, której przez 28 dni podawano puste kapsułki żelatynowe; 2) zwierzęta otrzymujące kapsułki z BPA w dawce - 0,05 mg/kg m.c./dzień oraz 3) świnię, gdzie dawka BPA wynosiła 0,5 mg/kg m.c./dzień.

W trakcie badań wykazano, iż obie dawki BPA wpływały nie tylko na liczebność włókien współczulnych i przywspółczulnych zlokalizowanych w ścianie macicy, ale także powodowały zmiany w ich neurochemicznej charakterystyce. Nasilenie i charakter zmian zależały od dawki BPA, badanego fragmentu macicy oraz części ściany macicy, w której zlokalizowane były włókna nerwowe.

Obserwowane zmiany były zdecydowanie wyraźniejsze po zastosowaniu wysokiej dawki badanej toksyny. Generalnie polegały one zarówno na wzroście ogólnej gęstości włókien współczulnych i przywspółczulnych w ścianie macicy, jak i na zwiększeniu stopnia zawartości innych substancji aktywnych (takich jak substancja P, naczynioaktywny polipeptyd jelitowy, peptyd kodowany genem kalcytoniny, galanina i neuronalna izoforma syntazy tlenu azotu) w tych włóknach.

Wyniki niniejszych badań wykazały, że unerwienie macicy bierze udział w procesach adaptacyjnych i protekcyjnych będących odpowiedzią organizmu na zatrucie BPA. Prawdopodobnie obserwowane zmiany wynikały z neurotoksycznej i/lub prozapalnej aktywności BPA, ale dokładne mechanizmy prowadzące do zmian neurochemicznej charakterystyki włókien nerwowych w ścianie macicy wciąż pozostają nieznane. Co ważne wykazano również, iż niskie dawki BPA (uznawane do niedawna za całkowicie bezpieczne) nie są obojętne dla organizmów żywych, gdyż mogą wpływać na neurochemiczną charakterystykę włókien nerwowych zaangażowanych w unerwienie macicy. Zmiany gęstości włókien nerwowych immunoreaktywnych wobec poszczególnych substancji aktywnych stanowią mogą pierwszy objaw zatrucia organizmu wywołanego przez BPA.

\* Badania finansowane ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (projekt promotorski nr 05-1/KNOW2/2015).

1 – e-mail: [liliana\\_rytel@wp.pl](mailto:liliana_rytel@wp.pl)

## **SESJA PLENARNA III**

## **Chemokiny jako modulatory funkcji rozrodczych u świni**

A. Andronowska

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie*

Chemokiny to niskocząsteczkowe białka (8-12 kDa), należące do grupy cytokin, które regulują chemotaksję komórek immunologicznych oraz pełnią różnorodne funkcje regulacyjne. Wyróżnia się chemokiny homeostatyczne, konstytutywnie wydzielane w tkankach oraz prozapalne, których ekspresja jest indukowana przez różne czynniki. Chemokiny, działając poprzez swoje receptory sprzężone z białkiem G, mogą aktywować różne szlaki sygnałowe i wywoływać różną odpowiedź komórkową. Chociaż głównym źródłem chemokin są komórki immunologiczne, to inne komórki również mają zdolność ich produkcji. Badania ostatnich lat wskazują, iż chemokiny mogą być pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane w procesy rozrodcze takie jak: owulacja, luteoliza ciała żółtego (CL) czy implantacja zarodka.

Sukcesem rozrodczym jest wydanie na świat zdrowego potomka. Prawidłowy przebieg ciąży jest ściśle związany z odpowiednim dialogiem pomiędzy matką a rozwijającym się zarodkiem. Nieprawidłowości na każdym etapie komunikacji maczyno-płodowej jak np. problemy z uzyskaniem receptywności śluzówki macicy, wydłużanie i rozwój trofoblastu, implantacja zarodka oraz ustanowienie funkcjonalnego łożyska czy też niedomoga lutealna mogą prowadzić do utraty płodu, która dotyczy wysokiego odsetka zarodków świni.

Badania te podejmują próbę wyjaśnienia udziału chemokin w niektórych aspektach rozrodczych w okresie okołimplantacyjnym u świni. Wykazano, że źródłem chemokin zarówno w endometrium jak i w ciałku żółtym są nie tylko komórki immunologiczne. W ciałku żółtym chemokiny mogą być produkowane przez komórki lutealne, natomiast w endometrium ich syntezę obserwowano w komórkach nabłonka powierzchniowego, w śródbłonku naczyń krwionośnych, w komórkach zrębu a także w rozwijającym się zarodku. Wykazano, iż lokalnie wydzielane w CL chemokiny mogą regulować syntezę progesteronu, niezbędnego do prawidłowego przebiegu ciąży. Natomiast w macicy biorą udział w procesach przebudowy endometrium oraz implantacji zarodka. Są także czynnikami warunkującymi prawidłowy rozwój naczyń krwionośnych.

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

## Wpływ rodzaju i poziomu inuliny w paszy na stężenie mucyn w okrężnicy prosiąt\*

M. Barszcz<sup>1,2</sup>, E. Świąch<sup>1</sup>, A. Tuśnio<sup>1</sup>, M. Taciak<sup>1</sup>, J. Skomial<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk*

Inulina jest polisacharydem zapasowym występującym w ponad 30000 gatunków roślin. Jest mieszaniną liniowych oligo- i polimerów fruktozy, w których jednostki fruktozowe połączone są wiązaniami  $\beta(2\rightarrow1)$ -glikozydowymi. Długość łańcucha (stopień polimeryzacji) wynosi od 2 do 60 jednostek. Średni stopień polimeryzacji naturalnej inuliny ekstrahowanej z korzenia cykorii (*Cichorium intybus* L.) wynosi 10, natomiast inuliny długołańcuchowej, otrzymywanej w wyniku frakcjonowania, ok. 25. Długość łańcucha determinuje aktywność biologiczną inuliny w jelicie grubym. Mechanizmy oddziaływania tego polisacharydu mogą być związane z funkcjonowaniem bariery anatomiczno-fizjologicznej w jelicie, której jednym z elementów są mucyny, glikoproteiny będące głównym składnikiem śluzu wydzielanego przez komórki kubkowe. Celem badań było określenie wpływu stopnia polimeryzacji i poziomu inuliny w paszy na stężenie mucyn w śluzie z okrężnicy prosiąt.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na 56 prosiątach podzielonych na 7 grup (n=8) żywionych od 10 do 50 dnia życia paszami: bez dodatku inuliny, z 1, 2 lub 3% dodatkiem inuliny z korzenia cykorii o średnim stopniu polimeryzacji równym 10 (IN10) oraz z 1, 2 lub 3% dodatkiem inuliny o średnim stopniu polimeryzacji równym 23 (IN23). Po zakończeniu doświadczenia prosięta uśmiercono i pobrano zeszkrobiny z błony śluzowej początkowego, środkowego i końcowego odcinka okrężnicy w celu izolacji i analizy mucyn. Mucyny wyizolowano z zeszkrobin metodą wykorzystującą ich oporność na aktywność proteaz i oczyszczono przez dializę. Stężenie mucyn oznaczono metodą fluorymetryczną na podstawie reakcji cyjanoacetamidu z cukrami redukującymi znajdującymi się na końcach łańcuchów oligosacharydowych, zawierających specyficzne dla mucyn wiązania O-glikozydowe. Fluorescencję prób zmierzono przy użyciu spektrofлуorymetru SpectraMax iD3 (Molecular Devices). Wyniki poddano jedno- i dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) oraz testowi Least Significant Difference (LSD) w programie Statgraphics.

Żywienie prosiąt paszą z 1% dodatkiem IN23 zmniejszyło stężenie mucyn w początkowym odcinku okrężnicy w porównaniu z grupą kontrolną i grupami z 2% i 3% dodatkiem IN23. Poziom IN10 nie wpłynął na stężenie mucyn w tej części okrężnicy, natomiast istotny wpływ miała interakcja między rodzajem i poziomem inuliny w paszy, gdyż 2% dodatek IN10 zmniejszył, a 2% dodatek IN23 zwiększył ich zawartość w śluzie. W środkowym odcinku okrężnicy stężenie mucyn było niższe u prosiąt otrzymujących pasze z 2% i 3% dodatkiem IN23 w porównaniu z grupą kontrolną i grupą z 1% dodatkiem IN23. Ponadto, dwuczynnikowa ANOVA wykazała zmniejszenie stężenia mucyn u prosiąt żywionych paszami z 2% i 3% dodatkiem inuliny, niezależnie od długości łańcucha, w porównaniu z 1% dodatkiem. W końcowym odcinku okrężnicy poziom IN10 i IN23 w paszy nie wpłynął na zawartość mucyn. Wykazano natomiast istotny wpływ rodzaju inuliny, gdyż u prosiąt żywionych paszami z IN23 ich stężenie było wyższe niż u prosiąt otrzymujących pasze z IN10.

Żywienie prosiąt paszami z dodatkiem inuliny może wpływać na stężenie mucyn w okrężnicy, jednak wpływ ten jest zależny od segmentu jelita. Poziom inuliny w paszy wpływa na zawartość mucyn w śluzie początkowego i środkowego odcinka okrężnicy, a rodzaj inuliny wpływa na ich stężenie w końcowym odcinku. Inulina o wyższym stopniu polimeryzacji może korzystniej wpływać na barierę ochronną okrężnicy niż inulina będąca mieszaniną krótszych łańcuchów fruktozowych.

\* Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju – NR12 0067 10.

2 – e-mail: [m.barszcz@ifzz.p.l](mailto:m.barszcz@ifzz.p.l)

# Wpływ dodatku tanin hydrolizujących w dawkach pokarmowych dla owiec na populację orzęsków oraz aktywność enzymatyczną treści żwacza\*

M.P. Majewska<sup>1,2</sup>, R. Miltko<sup>1</sup>, G. Bełżecki<sup>1</sup>, B. Kowalik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Żywienia Zwierząt, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

W żywieniu zwierząt przeżuujących coraz częściej poszukuje się naturalnych dodatków, mających wpływ na procesy trawienne zachodzące w żwaczu, a w konsekwencji na jakość produktów pochodzenia zwierzęcego. Przykładem takich dodatków są taniny, zaliczane do związków polifenolowych, powszechnie występujące w królestwie roślin. Ze względu na zróżnicowaną budowę chemiczną i aktywność biologiczną taniny dzieli się na hydrolizujące i skondensowane. W ostatnich latach wykazano, że dodatki paszowe zawierające taniny mogą wpływać na liczebność mikroorganizmów żwacza, strawność składników pokarmowych oraz profil kwasów tłuszczowych w mleku i mięsie.

Celem badań było określenie wpływu dodatku ekstraktu z kory dębu lub czystego kwasu taninowego, jako źródła tanin hydrolizujących, w dawkach pokarmowych dla owiec na liczebność orzęsków oraz aktywność hydrolaz w treści żwacza.

Badania przeprowadzono na 3 maciorkach rasy polska owca nizinna o średniej masie ciała około 48,7 ± 4,31 kg, zaopatrzonych w przetoki do żwacza, w układzie naprzemiennym. Zwierzęta podzielono na 3 grupy żywieniowe. Owce w grupie kontrolnej (KON) otrzymywały dawkę podstawową składającą się z siana łąkowego (58,8%), śruty jęczmiennej (29,4%), poekstrakcyjnej śruty sojowej (9,8%) oraz mieszanki mineralno-witaminowej (2%). Zwierzęta w grupach doświadczalnych otrzymały dawkę podstawową z dodatkiem 13 g ekstraktu z kory dębu (EKD) lub 4 g kwasu taninowego (KWT). Ilość zastosowanych dodatków dla owiec została wyrównana pod względem ilości zawartych w nich tanin hydrolizujących. Okres adaptacyjny do dawek pokarmowych wynosił 21 dni. Po tym czasie przez 2 kolejne dni od zwierząt pobrano płyn i treść żwacza przed karmieniem oraz 2, 4 i 8 godzin po podaniu paszy. Materiał badawczy pobrano z różnych miejsc żwacza w celu otrzymania reprezentatywnej próby. Pobrany płyn żwaczowy przesączono i oznaczono w nim pH oraz liczebność orzęsków. Liczebność pierwotniaków, utrwalonych roztworem 4% formaliny, klasyfikowano wg klucza Dogiela (1927) i oznaczono przy użyciu mikroskopu świetlnego. W treści oznaczono aktywność celulolityczną, ksylanolityczną, amylolityczną oraz pektynolityczną na podstawie ilości uwolnionych cukrów redukujących przy użyciu spektrofotometru (Miltko i wsp., 2016).

Badane dodatki nie miały istotnego wpływu na odczyn płynu żwaczowego. U owiec grupy EKD i KWT stwierdzono zmniejszenie liczebności ogólnej orzęsków oraz pierwotniaków z rodzaju *Entodinium* 4 godziny po karmieniu w porównaniu do grupy KON. Ponadto, dodatek EKD w dawkach dla owiec istotnie zmniejszył liczebność pierwotniaków z rodzaju *Dasytricha* 4 i 8 godzin po karmieniu, jak również zwiększył liczebność orzęsków z rodzaju *Isotricha* 2 godziny po podaniu paszy w porównaniu do owiec grupy KON. Dodatek KWT w dawce pokarmowej spowodował istotny wzrost liczebności pierwotniaków z rodzajów *Diplodinium*, *Ophryoscolex* oraz *Isotricha* przed karmieniem w porównaniu do owiec grupy EKD. Zastosowane dodatki nie miały istotnego wpływu na aktywność hydrolityczną treści żwacza, za wyjątkiem KWT, który zmniejszył aktywność celulolityczną treści przed karmieniem w porównaniu do owiec grupy KON.

Podsumowując, zastosowane dodatki tanin hydrolizujących w dawkach pokarmowych dla owiec wpłynęły na liczebność orzęsków oraz aktywność celulolityczną treści żwacza.

Dogiel VA., 1927. Archiv für Protistenkunde 59: 1–282

Miltko i wsp., 2016. Turk J Vet Anim Sci 40: 271–277

\* Badania przeprowadzono w ramach „Grantu na start”, finansowanego z funduszy Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk.

2 - e-mail: [m.majewska@ifzz.pl](mailto:m.majewska@ifzz.pl)

## **Rola kanału jonowego TRPV1 w funkcjonowaniu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psa domowego (*Canis lupus familiaris*)\***

J. K. Bujak<sup>1</sup>, D. Kosmala<sup>1</sup>, I. Szopa<sup>1</sup>, K. Majchrzak<sup>1</sup>, P. Bednarczyk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Katedra Biofizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

Rodzina kanałów jonowych TRP bierze udział w sygnalizacji wapniowej niezbędnej w indukcji takich procesów jak regulacja transkrypcji genów, proliferacja czy różnicowanie komórek. Kanały TRP są aktywowane poprzez czynniki fizyczne i chemiczne takie jak temperatura, pH czy aktywne związki pochodzenia roślinnego np. geraniol, mentol czy kapsaicyna. Wrażliwość na temperaturę, pH, ROS oraz udział w sygnalizacji wapniowej sprawiają, że kanały TRP mogą potencjalnie regulować odpowiedź immunologiczną. Pośród kanałów TRP, TRPV1, znany jako receptor dla kapsaicyny, jest aktywowany przez wysoką temperaturę, H<sup>+</sup>, LPS ale również wykazuje wrażliwość na cytokiny prozapalne takie jak IL-1β, IL-6 and TNF-α. Z tego względu TRPV1 może potencjalnie wpływać i modulować funkcjonowanie komórek układu odpornościowego.

Głównym celem badań było: 1) ustalenie czy kanał TRPV1 wykazuje funkcjonalną ekspresję w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) psa domowego oraz 2) ustalenie potencjalnego udziału kanału TRPV1 w kontekście relacji komórka-środowisko.

Ekspresja kanału TRPV1 w PBMC została potwierdzona zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Przy pomocy techniki patch-clamp udało się wykazać istnienie kanału jonowego wrażliwego na kapsaicynę. Również analiza dokomórkowego napływu jonów wapnia potwierdziła istnienie kanału jonowego dla jonów wapnia, wrażliwego na temperaturę oraz kapsaicynę. Niskie pH (6.0) znacząco wpłynęło na obniżenie aktywacji limfocytów T, niemniej nie było to powiązane z obniżeniem wewnątrzkomórkowego pH. Obecność receptorów wrażliwych na temperaturę oraz pH może częściowo tłumaczyć wpływ tych czynników na funkcjonowanie komórek układu immunologicznego.

---

\* Badania finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w ramach Grantu nr 2016/21/N/NZ6/02137.  
e-mail: [joanna\\_bujak@sggw.pl](mailto:joanna_bujak@sggw.pl)

## Nanocząstki ZnO domieszkowane jonami Fe jako potencjalne źródło egzogenne żelaza dla zwierząt\*

P. Kielbik<sup>1,2,4</sup>, J. Kaszewski<sup>1,2,3</sup>, B. Dominiak<sup>1,2</sup>, M. Damentko<sup>1,2</sup>, J. Rosowska<sup>3</sup>, M. A. Gralak<sup>1</sup>, B. J. S. Witkowski<sup>3</sup>, Z. Gajewski<sup>2</sup>, M. Godlewski<sup>3</sup>, M. I. M. Godlewski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>2</sup>*Weterynaryjne Centrum Badawcze i Centrum Badań Biomedycznych, Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

<sup>3</sup>*Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie*

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do życia dla ludzi i zwierząt. Szacuje się, że u ludzi niedobór żelaza jest najczęściej występującym niedoborem żywieniowym oraz najczęstszą przyczyną niedokrwistości. Problem ten dotyczy również zwierząt, w szczególności u nowonarodzonych prosiąt, u których dochodzi do szybkiego wyczerpania rezerw żelaza, co w przypadku braku suplementacji prowadzi nieuchronnie do anemii. Aby temu zapobiec stosuje się standardową suplementację opartą najczęściej na iniekcyjnym podaniu dekstranu żelaza. Ta forma pociąga za sobą wiele negatywnych skutków – duży nakład pracy wraz z nakładem finansowym, dyskomfort psychiczny dla prosiąt oraz powstawanie odczynów, stanów zapalnych i obniżenie wartości rzeźnej w miejscach zastrzyku. Poszukiwanie nowych form suplementacji żelaza jest zasadne. Badane przez nas biodegradowalne nanocząstki tlenku cynku (ZnO) wykazywały pożądane i obiecujące efekty podczas badań in-vivo z wykorzystaniem myszy – były w stanie szybko dostać się do większości tkanek oraz ulegały degradacji skutkującej uwolnieniem przyłączonych pierwiastków. Nie wykazano toksycznego wpływu nanocząstek na zwierzęta. Wstępne badania in-vitro nie wykazały toksycznego działania nanocząstek ZnO domieszkowanych Fe (1% domieszkowania) na komórki. W celu weryfikacji działania powyższych nanocząstek na modelu zwierzęcym, dorosłym myszom Balb-c (n=37) podano dożołądkowo 0,3 ml zawiesiny nanocząstek: ZnO lub ZnO domieszkowanych jonami Fe. Po różnym czasie od aplikacji zawiesiny (24 godziny; 7 dni lub 1 miesiąc) zwierzęta zostały poddane eutanazji, przeprowadzono sekcje w celu pobrania tkanek oraz krwi do badań. Zebrany materiał poddano analizom pozwalającym na wstępną ocenę skuteczności dostarczania żelaza do tkanek żywego organizmu w formie biodegradowalnych nanocząstek.

---

\* Badania finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w ramach Grantu nr 2017/27/N/NZ4/01219.

4 – e-mail: [pskielbik@op.pl](mailto:pskielbik@op.pl)

## Okołodobowa ekspresja czynnika VEGF w mikronaczyniach krwionośnych mózgu\*

A. Szczepkowska<sup>1</sup>, A. Harazin<sup>2</sup>, L. Barna<sup>2</sup>, M. Kowalewska<sup>1</sup>, M.A. Deli<sup>2</sup>, J. Skipor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
PAN w Olsztynie;*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Węgierska Akademia Nauk, Szeged, Węgry*

Docieranie substancji do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest regulowane przez system barier mózgowia: barierę krew-mózg, zlokalizowaną w śródbłonku mikronaczyń krwionośnych mózgu (MM) i barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, zlokalizowaną w nabłonku spłotu naczyńwłókowego komór mózgu (SN). Bariery chronią OUN przed czynnikami potencjalnie szkodliwymi, jednocześnie ograniczając docieranie substancji terapeutycznych. W naszych badaniach wstępnych zaobserwowano wpływ rytmu okołodobowego na ekspresję białka czynnika wzrostu śródbłonka naczyń krwionośnych (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF), w SN u owiec. Z uwagi na fakt, że podobna regulacja może mieć miejsce również w MM oraz ze względu na dane literaturowe z ostatnich lat, wskazujące na możliwość stosowania VEGF w celu zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg podczas farmakoterapii działającej na poziomie OUN, celem pracy było poznanie dobowego profilu ekspresji VEGF w MM szczura.

Badania przeprowadzono na grupie 36 samców i 36 samic 3 miesięcznych szczurów Wistar, przetrzymywanych w sztucznych warunkach oświetlenia: 12 godz. światła/12 godz. ciemności. Zwierzęta uśmiercono w sześciu punktach czasowych tj. o godz.: 7:00 (1 godz. po włączeniu światła, n=12), 11:00 (n=12), 15:00 (n=12), 19:00 (1 godz. po wyłączeniu światła, n=12), 23:00 (n=12) oraz 3:00 (n=12). Zwierzęta poddawano dekapitacji, a z wyizolowanych mózgów w pierwszej kolejności pobierano próbki kory mózgowej (KM) oraz SN z komór boczných mózgu, a następnie izolowano MM. W próbach MM, KM i SN, pobranych w pierwszym punkcie czasowym (godz.7:00), metodą real-time PCR analizowano relatywną względem genu *Actb* (an. Actin -β) ekspresję genów markerowych: śródbłonka naczyń krwionośnych - *Pecam1* (ang. platelet and endothelial cell adhesion molecule 1), śródbłonka MM – *Cldn5* (ang. Claudin 5) oraz śródbłonka okienkowatych naczyń krwionośnych SN - *Plvap* (ang. plasmalemma vesicle-associated protein). Porównanie poziomu ekspresji wymienionych genów w MM, SN i KM pozwoliło na określenie poziomu czystości uzyskanych frakcji MM. W MM wyizolowanych we wszystkich punktach czasowych, analizowano ekspresję mRNA izoform VEGF: VEGF<sub>120</sub> i VEGF<sub>164</sub>, metodą digital PCR.

Wyniki analizy ekspresji genów markerowych potwierdziły prawidłowość zastosowanego protokołu izolacji MM. W MM zaobserwowano zróżnicowaną dobowo ekspresję izoformy VEGF<sub>164</sub>. Jej maksymalny poziom wykazano w nocy, (5 godz. po wyłączeniu światła - 23:00), a minimalny na początku dnia (1 godz. po włączeniu światła - 7:00). Wyniki te wskazują na potrzebę prowadzenia badań dotyczących dobowych zmian w ekspresji czynników kluczowych dla funkcjonowania barier mózgowia. Mogłoby to umożliwić również w ramach leczenia chorób OUN, projektowanie tzw. strategii chronoterapii, dostosowującej leczenie do dobowego rytmu organizmu.

\* 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: [a.szczepkowska@pan.olsztyn.pl](mailto:a.szczepkowska@pan.olsztyn.pl)

## **Ekspozycja na światło niebieskie powoduje spadek liczby neuronów zwojowych zawierających melanopsynę oraz ich włókien nerwowych w siatkówkach szczurów\***

N. Ziółkowska

*Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie*

Efekt negatywnego wpływu światła na siatkówkę budzi w ostatnich latach duże zainteresowanie, ze względu na stale wzrastające użycie urządzeń emitujących światło niebieskie o wysokiej energii. Dotychczas, wpływ światła niebieskiego na liczbę komórek zwojowych siatkówki zawierających melanopsynę (MRGCs) oraz gęstość ich włókien nie był badany. Melanopsyna (M), należy do grupy barwników światłoczułych, których maksimum absorpcji znajduje się w zakresie światła niebieskiego (470-480nm). Celem badań było porównanie liczby perikarionów MRGs oraz liczby ich włókien nerwowych w siatkówkach szczurów ekspozowanych na działanie światła niebieskiego i szczurów utrzymywanych w naturalnych warunkach oświetlenia.

Do badań użyto 3- miesięczne szczury rasy Wistar, które przydzielono do jednej z trzech grup. Szczury z grupy kontrolnej (n=10) utrzymywano w warunkach 12 godzin światła naturalnego i 12 godzin ciemności. Szczury z grupy ostrej (n=10) ekspozowano w sposób ciągły na działanie światła niebieskiego przez 48 godzin. Szczury z grupy przewlekłej (n=10) utrzymywano w warunkach 12 godzin światła niebieskiego i 12 godzin ciemności przez 10 dni. Źródłem światła niebieskiego były lampy LED (460-480nm, 150 lux). Preparaty siatkówek typu „whole mount” poddano barwieniom immunocytochemicznym z użyciem przeciwciał przeciwko melanopsynie (), a następnie analizowano i fotografowano z użyciem mikroskopu konfokalnego (LSM700, Zeiss). Analizę ilościową perikarionów M<sup>+</sup>RGCs wykonano przy użyciu programu Image J 1.51n. Gęstość unerwienia obliczono w oparciu o liczbę punktów przecięć włókien nerwowych z nałożoną siatką Mertza. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z korektą Bonferroni (p<0.05).

Badania wykazały istotny spadek perikarionów M<sup>+</sup>RGCs w grupie szczurów ekspozowanych na działanie światła niebieskiego w porównaniu z grupą kontrolną (gr. kontrolna, 1955 ± 497 (SD); gr. ostra, 618 ± 163; gr. przewlekła, 724 ± 266; gr. kontrolna vs. Gr. ostra, P<0.001; gr. kontrolna vs. Gr. przewlekła, P<0.001; gr. ostra vs. Gr. przewlekła, P=1.0). Wyraźny spadek obserwowano również w przypadku liczby M<sup>+</sup>-pozytywnych włókien nerwowych których było znacząco mniej w siatkówkach szczurów z grupy ostrej i przewlekłej w porównaniu z grupą kontrolną (gr. kontrolna, 94 ± 10; gr. ostra, 34 ± 2; gr. przewlekła, 53 ± 15; gr. kontrolna vs. gr. ostra, P<0.001; gr. kontrolna vs. gr. przewlekła, P<0.001; gr. ostra vs. gr. przewlekła, P=0.03). Wyniki badań wskazują że światło niebieskie powoduje znaczący spadek liczby perikarionów MRGC i gęstości M<sup>+</sup>- pozytywnych włókien nerwowych w siatkówce szczurów.

---

\* Badania finansowane z Grantu „Miniatura I”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

## Potencjalna rola białek KLF (Kruppel-like factors) w przedimplantacyjnym rozwoju zarodka królika (*Oryctolagus cuniculus*)

K. Filimonow, D. Winiarczyk, A. Piliszek

*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu*

Białka z rodziny KLF (Kruppel-like factor) są grupą 17 czynników transkrypcyjnych posiadających na końcu C trzy domeny palca cynkowego, które pozwalają na przyłączenie się tych białek do DNA. Do tej pory wykazano, że białka te biorą udział w proliferacji, apoptozie, różnicowaniu komórek, rozwoju zarodkowym, a także w utrzymaniu pluripotencji zarodkowych komórek macierzystych. Wykazano, na komórkach mysich, że jedno z białek z rodziny KLF – KLF4, jest jednym z czterech czynników za pomocą których można uzyskać indukowane komórki macierzyste (iPS), badania te zostały nagrodzone nagrodą Nobla w 2012.

Na podstawie analizy transkryptów czynników KLF w zarodkach królika można stwierdzić, że znaczna ich większość (13 z 16) jest obecna w przedimplantacyjnym rozwoju zarodka. W tym czasie dochodzi do różnicowania, a być może także i do determinacji pierwszych linii zarodkowych: trofektodermi (TE), epiblastu (Epi) oraz pierwotnej endodermi (PrE). Analizując prezentowane wyniki zwróciłam uwagę na ekspresję genów *Klf2*, *Klf4* oraz *Klf5*, które są odpowiedzialne za utrzymanie pluripotencji w zarodkowych komórkach macierzystych myszy (model *in vitro* Epi), a także *Klf17*, którego obecność wykryto w Epi w zarodkach ludzkich.

Badając lokalizację białek z rodziny KLF metodą immunofluorescencji pośredniej wykazałam, że zaskakująco białko KLF4 nie jest obecne wyłącznie w komórkach Epi, ale tylko w ich części, natomiast jest obecne w linii PrE i jej pochodnych. Innym białkiem z rodziny KLF, które zwróciło moją uwagę, jest KLF17. W zarodkach ludzkich wykryto obecność tego białka w linii Epi. Jednakże w zarodkach królika obecność tego białka zaobserwowałam tylko w stadium XI blastocysty, w komórkach endodermi dystalnej, ale nie proksymalnej. Wiadome jest, że KLF17 bierze udział w procesie EMT (epithelial – mesenchymal transition) w komórkach nowotworowych endometrium człowieka i wiadome jest także, że proces ten zachodzi w trakcie powstawania komórek endodermi dystalnej w zarodku myszy. Uzyskane wyniki sugerują, że białko KLF17 może brać udział w procesie EMT w komórkach endodermi w zarodku królika.

Czy u innych gatunków ssaków, w tym u człowieka, białka KLF mają taką samą rolę jak u myszy? Czy poznanie roli tej rodziny białek w przedimplantacyjnym rozwoju zarodków ssaków pomoże nam wreszcie, po wielu latach zmagania, otrzymać i utrzymać w hodowli *in vitro* zarodkowe komórki macierzyste innych gatunków niż mysz, człowiek i szczur? Na te pytania staram się odpowiedzieć.

## Regulacja apoptozy w oocyte i przedimplantacyjnym zarodku myszy\*

D. Winiarczyk<sup>1</sup>, A. Stankiewicz<sup>1</sup>, J. Modliński<sup>1</sup>, A. Piliszek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu*

Apoptoza to fizjologiczna, zaprogramowana genetycznie, samobójcza śmierć komórki. W tym procesie dochodzi do kondensacji chromatyny i jej agregacji przy błonie jądrowej, obkurczania cytoplazmy oraz do fragmentacji jądra. Procesy te najczęściej są poprzedzone rozkładem DNA na odcinki odpowiadające długości nukleosomu (ok. 180-200 pz).

Przypuszcza się, że każda komórka może ulec apoptozie. Tę zasadę można także zastosować do komórek zarodków przedimplantacyjnych myszy. Jednak nasze obserwacje poparte przez dane literaturowe sugerują, że apoptoza w rozwoju przedimplantacyjnym myszy nie zachodzi do etapu wczesnej blastocysty. Aby zbadać to zjawisko przeprowadziliśmy analizy transkryptomiczne za pomocą qPCR. Przeanalizowaliśmy geny pro- i antyapoptotyczne w 5 stadiach rozwoju przedimplantacyjnego myszy (oocyty, zygoty, zarodki 2-, 8- komórkowe oraz blastocysty) po 24 godz. hodowli *in vitro* z czynnikami proapoptotycznymi (staurosporyna i TNF $\alpha$ ). Morfologiczne apoptozę zaobserwowaliśmy tylko w oocytach oraz w stadium blastocysty. Nasze wyniki wskazują, że *SIRT1* może być kluczowym regulatorem apoptozy w przedimplantacyjnych zarodkach myszy. Najwyższy poziom ekspresji tego genu zaobserwowaliśmy w stadium zygoty, po czym następował stopniowy jego spadek. Pomimo wysokich poziomów ekspresji genów proapoptotycznych (*p53*, *Casp3*, *Bax*) obserwowanych na etapie zygoty i w stadium 2 komórek, apoptoza nie wystąpiła na tych etapach. Zbiega się to z wysokim poziomem ekspresji *SIRT1*, który może blokować zdolność indukowania apoptozy w komórkach wczesnych zarodków myszy.

---

\* Źródło finansowania: KRP/KNOW01/2015/01/DAWWIN grant

# Wpływ CO na epigenetyczną regulację promotorów wybranych genów zegara biologicznego u świni domowej\*

P. Gilun<sup>1,4</sup>, B. Wąsowska<sup>1</sup>, J. Kwiatkowska<sup>3</sup>, M. Koziorowska-Gilun<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, <sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, <sup>3</sup>Katedra Neurochirurgii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Dotychczasowe badania dotyczące regulacji dobowej oscylacji ekspresji genów molekularnego zegara biologicznego w podwzgórzu nie obejmowały badań epigenetycznych. Większość genów tworzących zegar, w sekwencji promotorowej posiada wyspy CpG ulegające metylacji lub demetylacji pod wpływem DNA-metylotransferazy.

Powyższe doświadczenie ukierunkowane było na sprawdzeniu czy CO jako humoralny sygnał światła może wpływać na oscylację ekspresji genów zegara w części przedwzrokowej podwzgórza świni domowej, a dokładniej skupiono się na epigenetycznej analizie genu *Per2*.

Do badań wykorzystano 24 niedojrzałe płciowo loszki świni domowej. Zwierzęta podzielono na 3 grupy (1-grupa utrzymywana w warunkach naturalnych, 2- grupa utrzymywana w ciemności której infundowano przez 72 h do żyły ocznej osocze bez dodatku CO, 3- grupa utrzymywana w ciemności której infundowano przez 72 h do żyły ocznej osocze z dodatkiem CO). Po zakończonym doświadczeniu zwierzęta uśmiercano w godzinach 12<sup>00</sup> i 24<sup>00</sup> po 4 z każdej grupy i pobrano tkanki podwzgórza. Następnie wyizolowano DNA, poddano konwersji i tak przygotowany materiał stanowił matrycę do reakcji PCR a następnie do pyrosekwencjonowania.

W tym celu zaprojektowano startery aby uzyskać 4 różne amplikony zawierające sekwencję E-box oraz D-box. Trzy z nich zawierały sekwencje niekanonicznych E-box (opisywanych jako CANNTG), a 1 zawierał sekwencję kanoniczną E-box (CATGTG) oraz sekwencję D-box (TTATGTAA). Wszystkie startery projektowane były we fragmencie 2600 pz. poniżej startu ATG sekwencji kodującej.

Analiza uzyskanych wyników wykazała zróżnicowanie w poziomach metylacji poszczególnych wysp CpG w zależności od ich umiejscowienia. W sekwencjach zawierających lub znajdujących się w pobliżu sekwencji niekanonicznych E-box wykryto wysoki poziom metylacji sięgający od 60 do 80%. Natomiast w przypadku sekwencji zawierającej kanoniczny E-box oraz D-box metylacja poszczególnych pozycji CpG wahała się między 10 a 5%.

Nie wykazano dobowych zmian w pojedynczych pozycjach CpG w grupach zwierząt 1 i 3 w dwóch sekwencjach położonych najdalej od ATG (2450 i 2000 pz). Z kolei w sekwencjach położonych w odległości 1200 pz. oraz 40 pz. od ATG obserwowano statystycznie istotne zmiany w metylacji wysp CpG. I tak w przypadku pierwszej sekwencji w 1 grupie wzrastała ona z 27% w ciągu dnia do 67% w ciągu nocy natomiast w 3 grupie wzrastała z 30% w ciągu dnia do 49 % w nocy. W sekwencji najbliższej ATG (40 pz) w grupie 1 dobowy poziom metylacji obniżał się z 8% w ciągu dnia do 5% w nocy natomiast w grupie 3 z 7% w dzień a do 5% w nocy. W obu przypadkach zmiany te były statystycznie istotne przy  $p \leq 0,01$  i  $p \leq 0,05$ .

Powyższe wyniki sugerują że regulacja ekspresji genu *Per2* może odbywać się na poziomie DNA, gdzie zmienne poziomy metylacji poszczególnych regionów CpG w sekwencji promotorowej mogą wpływać na dostępność części chromatyny dla czynników transkrypcyjnych bądź też w przypadku już przyłączonych czynników do promotora regulować szybkość transkrypcji.

\* Badania sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015 (programy ESR oraz PostDoc).

4 – e-mail: [p.gilun@pan.olsztyn.pl](mailto:p.gilun@pan.olsztyn.pl)







Więcej informacji: [www.know.wmw.sggw.pl](http://www.know.wmw.sggw.pl)



**Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący**

Konsorcjum Naukowe "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność"  
Leading National Research Centre  
Scientific Consortium "Healthy Animal - Safe Food"

