

Autoreferat

dr n. wet. Włodzimierz Markiewicz

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

1. Imię i nazwisko

Włodzimierz Markiewicz

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

2001 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie fizjologii rozrodu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza udziału neuropeptydu Y w regulacji przepływu krwi przez tętnicę jajnikową świni.

1991 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.09.1982 – 30.06.1983 Przed rozpoczęciem studiów pracowałem jako uczestnik Studenckiego Ochotniczego Hufca Pracy w Katedrze Farmakologii, Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie,

01.04.1995 – 30.11.2003 Asystent, Katedra Farmakologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

01.12.2003 - do chwili obecnej Adiunkt, Katedra Farmakologii, (od 2010 r. Katedra Farmakologii i Toksykologii), Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4. 1. Osiągnięcie pod tytułem

„Wpływ wybranych substancji aktywnych biologicznie na kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy świni w fazie lutealnej i wczesnej ciąży”

tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji oryginalnych:

4.1.1. Markiewicz W., Bogacki M., Blitek M., Jaroszewski J.J. (2016) *Comparison of the porcine uterine smooth muscle contractility on days 12-14 of the estrous cycle and pregnancy.* Acta Vet Scand, 58:20.

(MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₆ 1,230)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.1.2. Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2016) *β_2 - and β_3 -adrenergic receptors stimulation relaxes porcine myometrium in the peri-implantation period.* J Anim Sci, 94:4611-4618.

(MNiSW₂₀₁₆ 40; IF₂₀₁₆ 2,014)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.1.3. Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2017) *Influence of β_2 - and β_3 adrenoceptor agonists on contractile activity of the porcine myometrium in the luteal phase and the first days of pregnancy.* Pol J Vet Sci, 20:111-121.

(MNiSW₂₀₁₇ 20; IF₂₀₁₇ 0,719)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

Łączna punktacja 3 prac, wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi **90 punktów MNiSW**. Łączny współczynnik wpływu (IF) wynosi **3,963**.

Eksperymenty prowadzone w ramach badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących moją rozprawę habilitacyjną finansowano z tematu statutowego nr 15.610.008-300. Koszty publikacji dwóch prac (**4.1.1., 4.1.2.**) sfinansowano ze środków KNOW Konsorcjum "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (decyzja nr 05-1/KNOW2/2015).

4. 2. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.2.1. Wprowadzenie i cel przeprowadzonych badań

Powszechnie uznaje się, że kurczliwość macicy jest regulowana przez skomplikowane interakcje pomiędzy wieloma czynnikami. Nieprawidłowa kurczliwość macicy prowadzi do niepowodzenia implantacji, spontanicznych poronień, przedwczesnego porodu i wielu innych zaburzeń. Skurcz i relaksacja macicy jest kontrolowana przez autonomiczny układ nerwowy (Taneike i in. 1995) oraz wiele czynników auto-, para- i endokrynych (Cao i in. 2002, Kitazawa i in. 2003, Markiewicz i in. 2012). Skurcze macicy świni są stymulowane m.in. przez takie związki jak: acetylocholina (ACh) (Kitazawa i in. 1999), oksytocyna (OT) (Kitazawa i in. 2001a, Mueller i in. 2006, Dittrich i in. 2009), prostaglandyny $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) (Mueller i in. 2006, Kucharski i in. 2007, Dittrich i in. 2009) i E_2 (PGE_2) (Mueller i in. 2006, Dittrich i in. 2009, Jana i in. 2010), histamina (Kitazawa i in. 1997), neuropeptyd Y (NPY) (Markiewicz i in. 2003) i endotelina (Isaka i in. 2000). Natomiast rozkurcz macicy może powodować m.in. noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) (Kitazawa i in. 2001b) i tlenek azotu (Buxton 2004). Czynniki te oddziałują na kurczliwość mięśniówki gładkiej bezpośrednio lub pośrednio, wpływając na syntezę i uwalnianie innych substancji. Wykazano, że egzogenna i endogenna ACh powoduje skurcz mięśniówki gładkiej macicy poprzez aktywację głównie receptora muskarynowego M_3 (Kitazawa i in. 1999). W innych badaniach wykazano, że w miometrium świni występują receptory α_1 - i α_2 -adrenergiczne przy czym

dominującą rolę w pobudzeniu aktywności skurczowej indukowanej przez endogenną i egzogenną NA odgrywa receptor α_2 -adrenergiczny natomiast stymulacja receptorów β_2 -adrenergicznych hamuje aktywność skurczową macicy świni (Taneike i in. 1995, Kitazawa i in. 2001b). Powszechnie, wiadomo że OT stymuluje aktywność skurczową macicy poprzez receptory oksytocynowe (Kitazawa i in. 2001a) obecne w macicy (Franczak i in. 2005). Ponadto peptyd ten, działając poprzez receptory znajdujące się w błonie śluzowej i mięśniowej macicy, bierze udział w regulacji wydzielania $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGE_2 u świń (Franczak i in. 2006a, Franczak i Bogacki 2009). Prostaglandyna $\text{F}_{2\alpha}$ powoduje skurcz mięśni gładkich macicy świni poprzez receptory FP , EP_1 i EP_3 , natomiast rozkurcz poprzez receptory DP , IP i EP_2 . Podobnie, PGE_2 może powodować skurcz lub rozkurcz poprzez wpływ na poszczególne podtypy receptorów PE (Jana i in. 2010). Głównym źródłem prostaglandyn jest błona śluzowa macicy (Kieborz i in. 1991, Davis i Blair 1993, Mirando i in. 1993, Blitek i in. 2004, Waclawik i in. 2006), aczkolwiek zdolność do produkcji tych eikozanoidów wykazano również w błonie mięśniowej macicy (Arosh i in. 2004, Franczak i in. 2006b), zarodkach (Davis i in. 1983, Stone i in. 1986, Wilson i in. 2002, Waclawik i Zięcik 2007) i ciałku żółtym (Olofsson i Leung 1994, Diaz i in. 2000, Arosh i in. 2004, Costine i in. 2007, Waclawik i in. 2008) u większości gatunków ssaków. Prostaglandyny są uważane za istotne czynniki uczestniczące w rozwoju ciąży u świni, o czym świadczy fakt, że zahamowanie ich syntezy prowadzi do przerwania ciąży (Kraeling i in. 1985, Kelly i in. 2001). Ponadto, wpływają one także na przepływ krwi przez macicę, przepuszczalność naczyń krwionośnych, wytworzenie łożyska i rozwój zarodka w późniejszym okresie ciąży (Kraeling i in. 1985, Keys i Kennedy 1990, Ma i in. 1999, Erkinheimo i in. 2000, Duckworth i in. 2002, Kennedy i in. 2007).

Początek ciąży u świni jest podzielony na trzy okresy: okres po zapłodnieniu (1-10 dzień ciąży), maczyne rozpoznawanie ciąży (11-13 dzień) i implantacji (14-19 dzień) (Zięcik i in. 2011). Zatem okres między 12-tym a 14-tym dniem ciąży ma kluczowe znaczenie dla pomyślnej implantacji i aktywności ruchowej macicy, co jest szczególnie ważne dla migracji zarodków. Wiadomo, iż nieprawidłowe rozmieszczenie zarodków macicy świni skutkuje zbyt bliskim ich sąsiedztwem, co powoduje rywalizację o składniki odżywcze (Chen i Dziuk 1993, Pere i in. 1997, Rehfeld i in. 2006) i zaburza prawidłowy rozwój płodów.

Procesy przygotowujące organizm matki oraz zarodek do implantacji, jak również sama implantacja, są kluczowe dla utrzymania ciąży i dalszego rozwoju zarodka. Implantacja

składa się z trzech następujących po sobie faz. Faza pierwsza to umiejscowienie zarodków, faza druga - zakotwiczenie zarodków w nabłonku powierzchniowym błony śluzowej macicy, a w ostatniej fazie dochodzi do ustanowieniem trwałego połączenia pomiędzy zarodkiem a matką (Enders i in. 1986). W okresie przedimplantacyjnym komórki błony śluzowej macicy oraz zarodki muszą zsynchronizować swój rozwój. Warunkiem prawidłowej implantacji jest ściśle określona kolejność następujących po sobie zdarzeń w określonym przedziale czasowym, mających na celu przygotowanie zarówno zarodków, jak i macicy do tego procesu. Swoją obecność w macicy i gotowość do implantacji zarodki sygnalizują poprzez syntezę i sekrecję biologicznie aktywnych czynników, które na drodze parakrynej oddziałują na macicę (Artley i in. 1992). Proces ten zwany jest „matczynym rozpoznaniem ciąży” i warunkuje utrzymanie ciąży (Short i in. 1969, Bazer i in. 1989). W odpowiedzi na czynniki syntetyzowane przez zarodki dochodzi do zmian budowy nabłonka gruczołowego i powierzchniowego macicy, produkcji i wydzielania szeregu substancji, których celem jest odżywianie oraz wspieranie rozwoju zarodków.

Czynniki te mają również wpływ na aktywność skurczową macicy. Kurczliwość macicy świni podlega zmianom w przebiegu cyklu rujowego (Kitazawa i in. 2001b, Cao i in. 2002, Kucharski i in. 2007, Jana i in. 2010, Jana i in. 2013) oraz w ciąży (Kitazawa i in. 2003, Kurowicka i in. 2005, Markiewicz i in. 2016) i jest regulowana przez wiele czynników, w tym autonomiczny układ nerwowy (Taneike i in. 1995, Kitazawa i in. 1999, Kitazawa i in. 2001b). Od wielu lat wiadomo, że znaczącą rolę w regulacji kurczliwości mięśniówki gładkiej macicy odgrywa receptor β_2 -adrenergiczny. Stosowanie agonistów tego receptora powoduje relaksację myometrium szczura (Engstrom i in. 1997) i ludzi (Liu i in. 1998). Dlatego agoniści receptorów β_2 -adrenergicznych (salbutamol, terbutalina, rytodryna, fenoterol) są stosowani jako leki tokolityczne, czyli hamują nadmierną aktywność skurczową macicy (de Heus i in. 2009, Motazedian i in. 2010, Parida i in. 2013). Istotnym problemem podczas stosowania β_2 -mimetyków jest ich częściowa aktywność w stosunku do receptorów β_1 -adrenergicznych, które zlokalizowane są przede wszystkim w mięśniu sercowym i przewodzie pokarmowym co wiąże się z możliwością wystąpienia działań niepożądanych u matki takich jak: relaksacja przewodu pokarmowego, duszność, zaburzenia rytmu serca, niewydolność krążenia, a nawet zgon. Z kolei u płodu może wystąpić hipoglikemia, przerost mięśnia sercowego, kwasica, niedrożność jelit i krwawienie wewnątrzczaszkowe. Ostatnio

można zaobserwować zwiększone zainteresowanie rolą receptorów β_3 -adrenergicznych w regulacji aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej macicy u ludzi (Bardou i in. 2000, 2007, Denny i in. 2001, 2002, Rouget i in. 2005, Pędzińska-Betiuk i in. 2011) szczurów (Yurtcu i in. 2006, Clouse i in. 2007, Minorics i in. 2009) i myszy (Parida i in. 2013). Obecność funkcjonalnych receptorów β_3 -adrenergicznych wykazano w macicy ludzi we wczesnej ciąży (Bardou i in. 2000) oraz macicy nieciążarnej (Rouget i in. 2005) i ciężarnej u szczurów (Minorics i in. 2009) i myszy (Parida i in. 2013). Uzyskane wyniki wskazują na dominującą rolę receptora β_3 -adrenergicznego w kurczliwości ludzkiego myometrium (Rougeta i in. 2005). Ponadto powyższe badania wykazały zmienność gatunkową w zakresie aktywności farmakologicznej receptorów β_3 -adrenergicznych, a także heterogeniczną odpowiedź na stymulację tych receptorów. Aktywność skurczowa macicy, nieciążarnej ma istotny wpływ na transport nasienia w układzie rozrodczym oraz przemieszczanie i pozycjonowanie zarodków w rogach macicy. Fanchin i in. 1998 wykazali, że u kobiet o wysokiej aktywności skurczowej macicy występuje niższy wskaźnik ciąż po zapłodnieniu *in vitro* niż u kobiet z niską aktywnością skurczową. Dlatego, wydaje się, że prawidłowa aktywność skurczowa macicy w okresie po zapłodnieniu, może odgrywać ważną rolę w pomyślnej implantacji.

Konsekwencje nieprawidłowego rozmieszczenia zarodków u świni skutkują obniżoną liczbą prosiąt w miocie, co ma negatywny wpływ na ekonomikę produkcji trzody chlewnej (Legault 1985). Dlatego poznanie regulacji skurczowej w okresie wczesnej ciąży, może istotnie poszerzyć dotychczasową wiedzę w tym temacie.

4.2.2. Wpływ czynników aktywnych biologicznie na kurczliwość mięśniówki gładkiej świni w 12-14 dniu cyklu i 12-14 dniu ciąży

Aktywność skurczowa macicy świni ulega istotnym zmianom w cyklu jajnikowym. Dostępne wyniki badań wskazują, że okres między 12- a 14-tym dniem ciąży ma bardzo duże znaczenie w pomyślnej implantacji. Dlatego celem prowadzonych badań było określenie wpływu: ACh, NA, OT, PGF₂ α i PGE₂ na kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy świni oraz wykazanie czy obecność zarodków w okresie około-implantacyjnym zmienia istotnie aktywność skurczową w porównaniu z fazą lutealną.

4.2.2.1. Materiały i metody

Badania przeprowadzono na dziesięciu niedojrzałych płciowo loszkach o masie ciała $106 \pm 4,8$ kg, w wieku 7 miesięcy. Loszki poddano procedurze chirurgicznej w znieczuleniu ogólnym. Zwierzęta premedykowano przy użyciu azaperonu (2 mg/kg m.c. i.m.; Stresnil, Janssen Animal Health, Belgia) i ketaminy (12 mg/kg m.c. i.m.; VetaKetam, Vet-Agro, Polska) i znieczulano tiopentalem (20-30 mg/kg m.c. i.v.; Thiopental, Sandoz GmbH, Austria). Zabieg rozpoczynano od otwarcia powłok brzusznych zwierzęcia wzdłuż linii białej. Jeden z rogów macicy przecinano poprzecznie w odległości ok. 10-15 cm od trzonu. W miejscu cięcia zakładano szwy zamykające światło macicy. W ten sposób uzyskano model doświadczalny macicy składającej się z: a) jednego całego rogu i fragmentu rogu drugiego połączonego z trzonem macicy oraz b) odciętej części rogu drugiego (Wasielak i in. 2008). Po 10 dniach od zabiegu i zagojeniu się ran pooperacyjnych, wszystkie loszki stymulowano hormonalnie w celu wywołania rui. Zastosowano następujący schemat stymulacji: 750 I.U. eCG (Folligon; Intervet, Holandia) i po upływie 72 godz. 500 I.U. hCG (Chorulon; Intervet, Holandia). Następnie, 24 godz. po podaniu hCG 5 loszek inseminowano dwukrotnie w odstępach 12 godzinnych. U loszek tych do zapłodnienia i rozwoju zarodków dochodziło tylko w jednym rogu macicy. Pozostałe pięć loszek, które zostały poddane zabiegowi chirurgicznemu i stymulacji hormonalnej nie było inseminowane. Loszki ubijano odpowiednio w 12-14 dniu ciąży, licząc od dnia pierwszej inseminacji, bądź w 12-14 dniu cyklu, licząc od następnego dnia po podaniu hCG. Po uboju macice umieszczano na lodzie, po czym każdy z rogów przepłukiwano dwukrotnie 10 ml buforu fosforanowego (PBS) (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4). W przypadku loszek poddanych inseminacji, płukanie rogów macicy umożliwiało potwierdzenie ciąży. Zarodki wykazywały cechy morfologiczne formy nitkowatej, ale nie było możliwe ich policzenie ze względu na defragmentację spowodowaną wypłukiwaniem. Skrawki mięśniówki gładkiej (endometrium z miometrium i samo miometrium) o długości 3-4 mm pobierano z rogu macicy z zarodkami, z rogu odizolowanego oraz z rogu od loszek cyklicznych. Skrawki zawieszano w naczynkach inkubacyjnych zawierających płyn Krebsa-Ringera (mM/l): NaCl, 120.3; KCl, 5.9; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.2; NaHCO₃, 15.5; glukoza, 11.5; pH 7.4. i temp. 37° C wysycany karbogenem (95% O₂ i 5% CO₂). Po 60 - 90 min. preinkubacji badane wycinki

stymulowano: ACh (10^{-5} i 10^{-4} M), NA (10^{-7} i 10^{-6} M), OT (10^{-7} i 10^{-6} M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-8} i 10^{-7} M) i PGE_2 (10^{-8} i 10^{-7} M). Dawki podawanych substancji wybrano w oparciu o wcześniejsze badania (Kurowicka i in. 2005, Kucharski i in. 2007, Jana i in. 2010, Jana i in. 2013). Aktywność skurczową mięśniówki gładkiej określano z wykorzystaniem zestawu do pomiaru skurczów izometrycznych Hugo Sachs Elektronik. Aktywność skurczową mierzono przez 10 minut po podaniu każdego ze stężeń badanej substancji. Na końcu badania każdej z substancji naczynka inkubacyjne przemywano 3-krotnie 15 ml roztworu Krebsa-Ringera w 10 min. odstępach czasu.

4.2.2.2. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność skurczowa była wyższa w rogu macicy z zarodkami w porównaniu z rogiem macicy bez zarodków oraz wyższa w macicy ciężarnej w porównaniu z macicą cykliczną. Również Pope i in. 1982 wykazali, że kurczliwość mięśniówki macicy zwiększała się wraz z migracją zarodków. W naszych badaniach ACh powodowała wzrost napięcia mięśniówki gładkiej macicy we wszystkich grupach, ale był on najwyższy w skrawkach pobranych z rogu ciężarnego. Z kolei amplituda ulegała zmniejszeniu we wszystkich badanych grupach. Natomiast, częstotliwość skurczów w macicy cyklicznej i bez zarodków była wyższa w porównaniu do rogu macicy z zarodkami. Druga z badanych substancji, tj. NA nie wpływała istotnie na napięcie mięśniówki gładkiej we wszystkich badanych grupach ale powodowała istotnie wyższy spadek amplitudy i częstotliwości skurczów w grupie z zarodkami w porównaniu do grupy cyklicznej i bez zarodków, co wskazuje, że obecność zarodków w macicy wpływa na regulację jej aktywności skurczowej. OT powodowała największy wzrost napięcia i częstotliwości skurczów w rogu macicy z zarodkami. Franczak i Bogacki 2009 stosując ten sam model świni wykazali, że produkty zarodka mogą lokalnie regulować ekspresję mRNA dla receptorów OT w macicy świni. Rola receptorów OT na początku ciąży nie jest w pełni zrozumiała. Przypuszcza się, że peptyd ten, w wyniku interakcji z receptorami, wpływa na wydzielanie prostaglandyn, w tym $\text{PGF}_{2\alpha}$ i PGE_2 . W naszym badaniu $\text{PGF}_{2\alpha}$ spowodowała największy wzrost napięcia i amplitudy skurczów w grupie z zarodkami oraz spadek częstotliwości skurczów we wszystkich badanych grupach. Najslabszy wpływ spośród wszystkich badanych substancji zaobserwowano po podaniu PGE_2 , która zwiększała częstotliwość skurczów jedynie w

skrawkach endometrium z miometrium pobranych z rogu z zarodkami. Prostaglandyny są uważane za najistotniejsze czynniki biorące udział w ustanowieniu ciąży u świni, o czym świadczy utrata ciąży na skutek zahamowania ich syntezy (Kraeling i in. 1985, Kelly i in. 2001).

Reasumując, aktywność skurczowa mięśniówki gładkiej pobranej z rogów macicy z zarodkami była wyższa niż z rogów odizolowanych oraz z rogów loszek cyklicznych. Prawdopodobnie jest to związane z migracją i równomiernym rozmieszczaniem zarodków wzdłuż rogów macicy oraz ich implantacją. Uzyskane wyniki sugerują, że obecność zarodków zwiększa uwalnianie szeregu substancji, które poprzez auto- i parakrynną regulację wpływają na aktywność skurczową macicy.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pierwszej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Markiewicz W., Bogacki M., Blitek M., Jaroszewski J.J. (2016) *Comparison of the porcine uterine smooth muscle contractility on days 12-14 of the estrous cycle and pregnancy. Acta Vet Scand, 58:20.*

4.2.3. Udział receptorów β_3 -adrenergicznych w regulacji aktywności skurczowej macicy świni w okresie około-implantacyjnym

Wiadomo, że w regulacji kurczliwości mięśniówki gładkiej macicy istotną rolę odgrywa receptor β_2 -adrenergiczny stąd agonści tego receptora są stosowani jako leki tokolityczne. Jednakże najnowsze badania wykazały negatywny wpływ tych leków na układ sercowo-naczyniowy, zarówno matki jak i dziecka. Dlatego preparaty zawierające agonistów receptora β_2 -adrenergicznego są coraz rzadziej stosowane. Odkrycie receptora β_3 -adrenergicznego w macicy człowieka, szczura i myszy oraz poznanie efektu farmakologicznego wywoływanego jego pobudzeniem, może przyczynić się do poszukiwania nowej grupy leków tokolitycznych. Dlatego celem prowadzonych badań było sprawdzenie, czy receptor β_3 -adrenergiczny jest zaangażowany w regulację aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej macicy świni w okresie około-implantacyjnym oraz porównanie efektu tokolitycznego agonistów receptora β_2 - i β_3 -adrenergicznego.

4.2.3.1. Materiały i metody

Badania przeprowadzono na ośmiu niedojrzałych płciowo loszkach o masie ciała $104 \pm 4,6$ kg w wieku 30 tyg. Loszki stymulowano hormonalnie w celu wywołania rui a następnie inseminowano i w 12-14 dniu ciąży ubijano (procedury indukcji rui i inseminacji opisano w pierwszej pracy). W pierwszej pracy opisano również procedury przygotowania skrawków miometrium i pomiaru kurczliwości. Po 60 - 90 min. preinkubacji badane wycinki stymulowano: salbutamolem - selektywnym agonistą receptora β_2 -adrenergicznego w stężeniach 10^{-9} – 10^{-5} M lub BRL 37344 - selektywnym agonistą receptora β_3 -adrenergicznego w stężeniach 10^{-9} – 10^{-5} M. W kolejnym etapie badań 15 min. przed podaniem agonistów do łaźni wodnej dodawano antagonistów receptorów β -adrenergicznych: butoksaminę (selektywnego antagonistę receptora β_2 -adrenergicznego), propranolol (nieselektywnego antagonistę receptora β_1 - i β_2 -adrenergicznego) i bupranolol (nieselektywnego antagonistę receptora β_1 -, β_2 - i β_3 -adrenergicznego) w stężeniu 10^{-4} M.

4.2.3.2. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno salbutamol jak i BRL 37344 zmniejszyły napięcie, częstotliwość i amplitudę skurczów ale zmiany te były silniej wyrażone po podaniu salbutamolu. Badanie to wykazało również, że salbutamol zmniejszył napięcie poprzez wpływ na receptory β_2 -adrenergiczne, bez widocznego oddziaływania na receptory β_1 - i β_3 -adrenergiczne. Natomiast działanie BRL 37344 związane było głównie z wpływem na receptory β_3 -adrenergiczne z możliwym dodatkowym oddziaływaniem na receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczne. Sugestia ta wynika z faktu, że podanie antagonisty receptorów β_2 -adrenergicznych (butoksaminy) znacząco hamowało działanie relaksujące salbutamolu, głównie poprzez hamowanie spadku napięcia i w mniejszym stopniu częstotliwości i amplitudy skurczów. Ten sam, antagonistę zmienił również efekt działania BRL 37344 ale był on odmienny niż po podaniu salbutamolu; spadek napięcia był silniejszy po podaniu wysokich dawek agonisty natomiast zmiany w amplitudzie i częstotliwości skurczów były mniejsze w porównaniu do działania samego agonisty. Po wcześniejszym podaniu propranololu obserwowano hamowanie działania obu agonistów, jednakże efekt ten był bardziej widoczny w przypadku salbutamolu niż BRL 37344. Bupranolol całkowicie znosił relaksujące działanie BRL 37344, co potwierdza występowanie receptorów β_3 -

adrenergicznych w mięśniówce gładkiej macicy świń w okresie około-implantacyjnym. Bupranolol hamował również relaksujące działanie salbutamolu, jednakże w przypadku częstotliwości i amplitudy skurczów działanie to było słabsze w porównaniu do hamowania działania BRL 37344, co sugeruje, że obserwowane zmiany w działaniu salbutamolu były związane z regulacją β_2 -adrenergiczną. Podobny antagonistyczny wpływ bupranololu na działanie BRL 37344 i ritodryny (agonisty β_2 -adrenergicznego) obserwowano w badaniach skrawków macicy pobranych od kobiet w cyklu (Pędzińska-Betiuk i in. 2011). Obserwowane w badaniach własnych zmiany w działaniu BRL 37344 po wcześniejszym podaniu antagonistów wskazują na istnienie dodatkowego mechanizmu działania BRL 37344, który nie jest związany jedynie z aktywacją receptorów β_3 -adrenergicznych. We wcześniejszych badaniach wykazano, że propranolol i BRL 37344 wykazują powinowactwo do receptorów α -adrenergicznych w aorcie szczura (Brahmadevara i in. 2004, Leblais i in. 2004). Ponadto Kitazawa i in. (2000) wykazali, że stymulacja receptorów α_2 -adrenergicznych powoduje skurcz miometrium świni. Również badania Pędzińskiej-Betiuk i in. (2011), w których badano kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy nieciążarnej u ludzi po podaniu propranololu i BRL 37344 wskazują, że działanie BRL 37344 nie jest związane jedynie ze stymulacją receptorów β_3 -adrenergicznych.

Reasumując uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że receptory β_3 -adrenergiczne są zaangażowane w relaksację macicy świni w okresie około-implantacyjnym. Ponadto wykazano, że zarówno salbutamol jak i BRL 37344 rozkurczają mięśniówkę gładką macicy świni, jednakże BRL 37344 wykazuje słabsze działanie niż salbutamol.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w drugiej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2016) β_2 - and β_3 -adrenergic receptors stimulation relaxes porcine myometrium in the peri-implantation period. J Anim Sci, 94:4611-4618.

4.2.4. Porównanie wpływu agonistów receptora β_2 - i β_3 -adrenergicznego na mięśniówkę gładką macicy świni w fazie lutealnej i w 3-5 dniu ciąży

Wcześniejsze wyniki badań wykazały (Markiewicz i in. 2016), że aktywność skurczowa macicy świni jest wyższa w okresie około-implantacyjnym w porównaniu do fazy

lutealnej cyklu jajnikowego. Aktualnie całkowicie nieznanym jest udział receptorów β -adrenergicznych w regulacji aktywności skurczowej macicy świni w pierwszych dniach po zapłodnieniu, tj. w okresie, który w istotnym stopniu decyduje o tym ile zarodków będzie uczestniczyło w kolejnych okresach rozwijającej się ciąży. Dlatego celem prowadzonych badań było określenie wpływu selektywnych agonistów receptora β_2 - i β_3 -adrenergicznego na aktywność skurczową macicy w 3-5 dniu ciąży oraz porównanie tego działania do aktywności skurczowej w fazie lutealnej.

4.2.4.1. Materiały i metody

Badania przeprowadzono na dwóch grupach zwierząt. Pierwszą stanowiły loszki ($n = 10$) w wieku ok. 7 miesięcy w 10-14 dniu cyklu. Fazę cyklu określano w oparciu o ocenę morfologiczną jajników i macicy (Leiser i in. 1988). Drugą grupę stanowiły loszki ($n = 6$) niedojrzałe płciowo o masie ciała 101-110 kg. Loszki stymulowano hormonalnie w celu wywołania rui a następnie inseminowano (według procedury opisanej w pierwszej pracy) i ubijano w 3-5 dniu ciąży. W pierwszej pracy opisano również procedurę przygotowania skrawków miometrium i pomiaru kurczliwości. Po 60 - 90 min. preinkubacji badane wycinki stymulowano: salbutamolem - selektywnym agonistą receptora β_2 -adrenergicznego w stężeniach $10^{-9} - 10^{-5}$ M lub BRL 37344 - selektywnym agonistą receptora β_3 -adrenergicznego w stężeniach $10^{-9} - 10^{-5}$ M. W następnym etapie badań 15 min. przed podaniem agonistów do łaźni wodnej dodawano antagonistów receptorów β -adrenergicznych: butoksaminę (selektywnego antagonistę receptora β_2 -adrenergicznego), propranolol (nieselektywnego antagonistę receptora β_1 - i β_2 -adrenergicznego) i bupranolol (nieselektywnego antagonistę receptora β_1 -, β_2 - i β_3 -adrenergicznego) w stężeniu 10^{-4} M.

4.2.4.2. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że salbutamol i BRL 37344 nie powodowały istotnych zmian w napięciu, jednak po podaniu tych substancji w wyższych stężeniach dochodziło do zmniejszenia częstotliwości i amplitudy skurczów. Zmiany te były bardziej widoczne po podaniu salbutamolu niż BRL 37344 oraz w macicach pobranych od zwierząt we wczesnej ciąży. Sugeruje to, że w pierwszych dniach ciąży reprezentacja i/lub reaktywność receptorów β_2 -adrenergicznych jest wyższa niż receptorów β_3 -adrenergicznych. Uzyskane wyniki badań

są zgodne z danymi uzyskanymi przez Kitazawę i in. (2001), którzy wykazali, że hamowanie aktywności skurczowej macicy świni przez katecholaminy jest regulowane głównie przez receptory β_2 -adrenergiczne. Jak wskazują wyniki naszych wcześniejszych badań podobna sytuacja ma również miejsce w okresie około-implantacyjnym (Markiewicz i Jaroszewski 2016). Prezentowane w pracy wyniki wskazują, że po podaniu samych antagonistów czyli butoksaminy, propranololu i bupranololu nie dochodziło do istotnych zmian w badanych parametrach. Wykazano również, że wcześniejsze podanie butoksaminy nie wpływało istotnie na działanie salbutamolu, ale skutkowało istotnym obniżeniem napięcia przez BRL 37344 w mięśniówce macicy pobranej od zwierząt we wczesnej ciąży. Wyniki te nie są zbieżne z danymi uzyskanymi w okresie około-implantacyjnym (Markiewicz i Jaroszewski 2016), w którym obserwowano hamowanie aktywności salbutamolu przez butoksaminę. Ponadto w prezentowanej pracy wykazano, że zarówno salbutamol jak i BRL 37344 podane po propranololu nie wpływały istotnie na zmiany w napięciu, ale obniżały częstotliwość i amplitudę skurczów w porównaniu do okresu przed podaniem badanych substancji. Zatem wpływ propranololu na działanie agonistów był podobny do działania obserwowanego w okresie około-implantacyjnym (Markiewicz i Jaroszewski 2016). Różnice w uzyskanych wynikach po zastosowaniu butoksaminy i propranololu we wczesnej ciąży wskazują, że aktywność receptorów β_2 -adrenergicznych jest ściśle zależna od okresu ciąży, oraz że aktywność skurczowa macicy świni jest zależna również od aktywności receptorów β_1 - i β_3 -adrenergicznych. W prezentowanej pracy wykazano, że salbutamol podany po bupranololu powodował wzrost napięcia i znacznie słabiej zmniejszał amplitudę skurczów w grupie cyklicznej. Ponadto, bupranolol eliminował spadek częstotliwości i powodował wzrost amplitudy wywoływany przez BRL 37344 w obu grupach, jednak zmiany te były bardziej widoczne w mięśniówce pobranej od zwierząt we wczesnej ciąży. Podobny antagonistyczny wpływ bupranololu na działanie BRL 37344 i ritodryny był obserwowany w macicy cyklicznej u ludzi (Pedzińska-Bietuk i in. 2011).

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują, że zarówno receptory β_2 - jak i β_3 -adrenergiczne są zaangażowane w regulację aktywności skurczowej macicy świni w cyklu i w pierwszych dniach ciąży, przy czym zmiany w aktywności skurczowej powodowane przez agonistów i antagonistów są silniej wyrażone w macicy zwierząt we wczesnej ciąży.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w trzeciej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2017) *Influence of β_2 - and β_3 adrenoceptor agonists on contractile activity of the porcine myometrium in the luteal phase and the first days of pregnancy.* Pol J Vet Sci, 20:111-121.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

- Obecność zarodków zwiększa aktywność skurczową mięśniówki gładkiej macicy świni.
- Receptory β_2 - i β_3 -adrenergiczne są zaangażowane w regulację aktywności skurczowej macicy świni zarówno w cyklu rujowym jak i we wczesnej ciąży.
- Mięśniówka gładka macicy świni w pierwszych dniach ciąży wykazuje większą wrażliwość na działanie agonistów i antagonistów receptorów β_2 -i β_3 -adrenergicznych niż w fazie lutealnej cyklu.
- Wpływ agonistów i antagonistów receptorów β_2 -i β_3 -adrenergicznych na aktywność skurczową macicy różni się w 3-5 i 12-14 dniu ciąży, co wskazuje na dynamiczne zmiany w kurczliwości tego narządu w pierwszych dwóch tygodniach ciąży.
- Agoniści receptorów β_2 -adrenergicznych (salbutamol) i β_3 -adrenergicznych (BRL 37344) rozkurczają mięśniówkę gładką macicy świni, jednakże BRL 37344 wykazuje słabsze działanie niż salbutamol w okresie około-implantacyjnym.

4.2.5. Piśmiennictwo

1. Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, MacLaren LA, Fortier MA. Effect of interferon τ on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E₂. *Endocrinology*. 2004a;145:5280-5293.
2. Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod*. 1992;7:1014-1021.
3. Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, Simon B, Naline E, Dumas M, Esteve S, Croci T, Chalon P, Frydman R, Sagot P, Manara L, Morcillo EJ, Advenier C. Functional,

- biochemical and molecular biological evidence for a possible β_3 -adrenoceptor in human near-term myometrium. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1960-1966.
4. Bardou M, Rouget C, Breuiller-Fouche M, Loustalot C, Naline E, Sagot P, Frydman R, Morcillo EJ, Advenier C, Leroy MJ, Morrison JJ. Is the beta3-adrenoceptor (ADRB3) a potential target for uterorelaxant drugs? *BMC Pregnancy Childbirth.* 7 Suppl. 2007;1:S14.
 5. Bazer FW, Vallet JL, Harney JP, Gross TS, Thatcher WW. Comparative aspects of maternal recognition of pregnancy between sheep and pig. *J Reprod Fertil. Suppl.* 1989;37:85-89.
 6. Blitek A, Zięcik AJ. Prostaglandins F2 α and E2 secretion by porcine epithelial and stromal cells on different days of the oestrous cycle. *Reprod Dom Anim.* 2004;39:340-346.
 7. Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A. α_1 -adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other β -adrenoceptor ligands: evidence against β_3 - or atypical β -adrenoceptors in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2004;142:781-787.
 8. Buxton IL. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Mol Pharmacol.* 2004;65:1051-1059.
 9. Cao J, Shayibuzhati M, Tajima T, Kitazawa T, Taneike T. In vitro pharmacological characterization of the prostanoid receptor population in the non-pregnant porcine myometrium. *Eur J Pharmacol.* 2002;442:115-123.
 10. Chen ZY, Dziuk PJ. Influence of initial length of uterus per embryo and gestation stage on prenatal survival, development, and sex ratio in the pig. *J Anim Sci.* 1993;71:1895-1901.
 11. Clouse AK, Riedel E, Hieble JP, Westfall TD. The effects and selectivity of β -adrenoceptor agonists in rat myometrium and urinary bladder. *Eur J Pharmacol.* 2007;573:184-189.
 12. Costine BA, Inskeep EK, Blemings KP, Flores JA, Wilson ME. Mechanisms of reduced luteal sensitivity to prostaglandin F2 α during maternal recognition of pregnancy in ewes. *Domest Anim Endocrinol.* 2007;32:527-533.
 13. Davis DL, Pakrasi PL, Dey SK. Prostaglandins in swine blastocysts. *Biol Reprod.* 1983;28:1114-1118.
 14. Davis DL, Blair RM. Studies of uterine secretions and products of primary cultures of endometrial cells in pigs. *J Reprod Fertil. Suppl.* 1993;48:143-153.

15. de Heus R, Mol BW, Erwich JJ, van Geijn HP, Gyselaers WJ, Hanssens M, Härmark L, van Holsbeke CD, Duvekot JJ, Schobben FF, Wolf H, Visser GH. Adverse drug reactions to tocolytic treatment for preterm labour: prospective cohort study. *Br Med J*. 2009;338:b744.
16. Denny MC, Friel AM, Gardeil F, Morrison JJ. β_3 versus β_2 adrenergic agonists and preterm labour: in vitro uterine relaxation effects. *BJOG*. 2001;108:605-609.
17. Denny MC, Houlihan DD, McMillan H, Morrison JJ. β_2 - and β_3 - adrenoreceptor agonists: human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187:641-647.
18. Diaz FJ, Crenshaw TD, Wiltbank MC. Prostaglandin F $_{2\alpha}$ induces distinct physiological responses in porcine corpora lutea after acquisition of luteolytic capacity. *Biol Reprod*. 2000;63:1504-1512.
19. Dittrich R, Mueller A, Oppelt PG, Hoffmann I, Beckmann MW, Maltaris T. Differences in muscarinic-receptor agonist-, oxytocin-, and prostaglandin induced uterine contractions. *Fertil Steril*. 2009;92:1694-1700.
20. Duckworth N, Marshall K, Clayton JK. An investigation of the effect of the prostaglandin EP2 receptor agonist, butaprost, on the human isolated myometrium from pregnant and non-pregnant women. *J Endocrinol*. 2002;172:263-269.
21. Erkinheimo TL, Saukkonen K, Narko K, Jalkanen J, Ylikorkala O, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3468-3475.
22. Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG. Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat*. 1986;177:161-185.
23. Engstrom T, Bratholm P, Vilhardt H, Christensen NJ. Effect of pregnancy on rat myometrial β_2 -adrenoceptor mRNA and isoproterenol-induced relaxation of isolated uterine strips. *J Endocrinol*. 1997;153:393-399.
24. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998;13:1968-1974.
25. Franczak A, Ciereszko R, Kotwica G. Oxytocin (OT) action in uterine tissues of cyclic and early pregnant gilts: OT receptors concentration, prostaglandin F $_{2\alpha}$ secretion, and phosphoinositide hydrolysis. *Anim Reprod Sci*. 2005;88:325-339.
26. Franczak A, Kurowicka B, Oponowicz A, Petroff BK, Kotwica G. The effect of progesterone on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of Ca $^{2+}$ and prostaglandin

- E₂ and F_{2α} secretion from porcine myometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006a;81:37-44.
27. Franczak A, Kotwica G, Kurowicka B, Oponowicz A, Wocławek-Potocka I, Petroff BK. Expression of enzymes of cyclooxygenase pathway and secretion of prostaglandin E₂ and F_{2α} by porcine myometrium during luteolysis and early pregnancy. *Theriogenology.* 2006b;66:1049-1056.
 28. Franczak A, Bogacki M. Local and systemic effects of embryos on uterine tissues during early pregnancy in pigs. *J Reprod Dev.* 2009;55:262-272.
 29. Isaka M, Takaoka K, Yamada Y, Abe Y, Kitazawa T, Taneike T. Characterization of functional endothelin receptors in the porcine myometrium. *Peptides.* 2000;21:543-551.
 30. Jana B, Jaroszewski JJ, Kucharski J, Koszykowska M, Górka J, Markiewicz W. Participation of prostaglandin E₂ in contractile activity of inflamed porcine uterus. *Acta Vet Brno.* 2010;79:249-259.
 31. Jana B, Jaroszewski JJ, Czarzasta J, Włodarczyk M, Markiewicz W. Synthesis of prostacyclin and its effect on the contractile activity of the inflamed porcine uterus. *Theriogenology.* 2013;79:470-485.
 32. Kelly AJ, Kavanagh J, Thomas J. Vaginal prostaglandin (PGE₂ and PGF_{2a}) for induction of labour at term. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;2:003101.
 33. Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reprod.* 2007;134:635-643.
 34. Keys JL, Kennedy TG. Effect of indomethacin and prostaglandin E₂ on structural differentiation of rat endometrium during artificially induced decidualization. *Am J Anat.* 1990;188:148-162.
 35. Kieborz KR, Silvia WJ, Edgerton LA. Changes in uterine secretion of prostaglandin F₂ alpha and luteal secretion of progesterone in response to oxytocin during the porcine estrous cycle. *Biol Reprod.* 1991;45:950-954.
 36. Kitazawa T, Shishido H, Sato T, Taneike T. Histamine mediates the muscle layer-specific responses in the isolated swine myometrium. *J Vet Pharmacol Ther.* 1997;20:187-197.
 37. Kitazawa T, Uchiyama F, Hirose K, Taneike T. Characterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the contractile response of acetylcholine in the swine myometrium. *Eur J Pharmacol.* 1999;367:325-334.

38. Kitazawa T, Maezono Y, Taneike T. The mechanisms of α_2 -adrenoceptor agonist-induced contraction in longitudinal muscle of the porcine uterus. *Eur J Pharmacol.* 2000;390:185–195.
39. Kitazawa T, Kajiwara T, Kiuchi A, Hatakeyama H, Taneike T. Muscle layer- and region-dependent distributions of oxytocin receptors in the porcine myometrium. *Peptides.* 2001a;22:963-974.
40. Kitazawa T, Nakagoshi K, Teraoka H, Taneike T. 5-HT(7) receptor and β_2 -adrenoceptor share in the inhibition of porcine uterine contractility in a muscle layer-dependent manner. *Eur J Pharmacol.* 2001b;433:187-197.
41. Kitazawa T, Hatakeyama H, Cao J, Taneike T. Pregnancy-associated changes in responsiveness of the porcine myometrium to bioactive substances. *Eur J Pharmacol.* 2003;469:135-144.
42. Kraeling RR, Rampacek GB, Fiorello NA. Inhibition of pregnancy with indomethacin in mature gilts and prepubertal gilts induced to ovulate. *Biol Reprod.* 1985;32:105-110.
43. Kucharski J, Jaroszewski JJ, Jana B, Górska J, Kozłowska A, Markiewicz W. The influence of inflammatory process on prostaglandin F₂alpha contractile activity in porcine uterus. *J Anim Feed Sci.* 2007;16:654-667.
44. Kurowicka B, Franczak A, Oponowicz A, Kotwica G. In vitro contractile activity of porcine myometrium during luteolysis and early pregnancy: effect of oxytocin and progesterone. *Reprod Biol.* 2005;5:151-169.
45. Leblais V, Pourageaud F, Ivorra MD, Guibert C, Marthan R, Muller B. Role of α -adrenergic receptors in the effect of the β -adrenergic receptor ligands, CGP 12177, bupranolol, and SR 59230A, on the contraction of rat intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:137–145.
46. Leiser R, Zimmermann W, Sidler X, Christen A. Normal cyclical morphology of the endometrium and ovary of swine. *Tierarztl Prax.* 1988;16:261-280.
47. Legault C. Selection of breeds, strains and individual pigs for prolificacy. *J Reprod Fertil. Suppl.* 1985;33:151-166.
48. Liu LY, Nwosu UC, Rice PJ. Relaxation of isolated human myometrial muscle by β_2 -adrenergic receptors but not β_1 -adrenergic receptors. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:895-898.
49. Ma X, Wu WX, Nathanielsz PW. Differential regulation of prostaglandin EP and FP receptors in pregnant sheep myometrium and endometrium during spontaneous term labor. *Biol Reprod.* 1999;61:1281-1286.

50. Markiewicz W, Jaroszewski JJ, Bossowska A, Majewski M. NPY: its occurrence and relevance in the female reproductive system. *Folia Histochem Cytobiol.* 2003;41:183-192.
51. Markiewicz W, Kamińska K, Bogacki M, Maślanka T, Jaroszewski JJ. Participation of analogues of lysophosphatidic acid (LPA): oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (L-alpha-LPA) and 1-oleoyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphothionate (OMPT) in uterine smooth muscle contractility of the pregnant pigs. *Pol J Vet Sci.* 2012;15:635-643.
52. Markiewicz W, Bogacki M, Blitek M, Jaroszewski JJ. Comparison of the porcine uterine smooth muscle contractility on days 12-14 of the estrous cycle and pregnancy. *Acta Vet Scand.* 2016;58:20.
53. Markiewicz W., Jaroszewski JJ. β_2 - and β_3 -adrenergic receptors stimulation relaxes porcine myometrium in the peri-implantation period. *J Anim Sci.* 2016;94:4611-4618.
54. Minorics R, Gáspár R, Gál A, Klukovits A, Falkay G. Progesterone decreases the relaxing effect of the β_3 -adrenergic receptor agonist BRL 37344 in the pregnant rat myometrium. *Reproduction* 2009;138:383-390.
55. Mirando MA, Becker WC, Whiteaker SS. Relationships among endometrial oxytocin receptors, oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F $_{2\alpha}$ secretion in vitro, and plasma concentrations of ovarian steroids before and during corpus luteum regression in cyclic heifers. *Biol Reprod.* 1993;48:847-882.
56. Motazedian S, Ghaffarpasand F, Mojtahedi K, Asadi N. Terbutaline versus salbutamol for suppression of preterm labor: a randomized clinical trial. *Ann Saudi Med.* 2010;30:370-375.
57. Mueller A, Maltaris T, Siemer J, Binder H, Hoffmann I, Beckmann MW, Dittrich R. Uterine contractility in response to different prostaglandins: results from extracorporeally perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod.* 2006;21:2000-2005.
58. Olofsson J, Leung PC. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;100:87-91.
59. Parida S, Uttam Singh T, Ravi Prakash V, Mishra SK. Molecular and functional characteristics of β_3 -adrenoceptors in late pregnant mouse uterus: a comparison with β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 2013;700:74-79.
60. Père MC, Dourmad JY, Etienne M. Effect of number of pig embryos in the uterus on their survival and development and on maternal metabolism. *J Anim Sci.* 1997;5:1337-1342.

61. Pędzińska-Betiuk A, Modzelewska B, Józwick M, Józwick M, Kostrzewska A. Differences in the effects of β_2 - and β_3 -adrenoceptor agonists on spontaneous contractions of human nonpregnant myometrium. *Ginekol Pol.* 2011;82:918-924.
62. Pope WF, Maurer RR, Stormshak F. Intrauterine migration of the porcine embryo-interaction of embryo, uterine flushings and indomethacin on myometrial function in vitro. *J Anim Sci.* 1982;55:1169-1178.
63. Rehfeldt C, Kuhn G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *J Anim Sci.* 2006;84:113-123.
64. Rouget C, Bardou M, Breuiller-Fouche M, Loustalot C, Qi H, Naline E, Croci T, Cabrol D, Advenier C, Leroy MJ. β_3 -adrenoceptor is the predominant β -adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1644-1650.
65. Short RV. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In *Foetal Autonomy. Ciba Foundation Symposium.* Churchill, London, 1969.
66. Stone BA, Seamark RF, Kelly RW, Deam S. Production of steroids and release of prostaglandins by spherical pig blastocyst in vitro. *J Biol Sci.* 1986;39:283-293.
67. Taneike T, Narita T, Kitazawa T, Bando S, Teraoka H, Ohga A. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenoceptors in isolated swine myometrium. *J Auton Pharmacol.* 1995;15:93-105.
68. Waclawik A, Rivero-Muller A, Blitek A, Kaczmarek MM, Brokken LSJ, Watanabe K, Rahman NA, Zięcik AJ. Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology.* 2006;147:210-221.
69. Waclawik A, Zięcik AJ. Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig. *Endocrinology.* 2007;194:499-510.
70. Waclawik A, Kaczmarek MM, Kowalczyk AE, Bogacki M, Zięcik AJ. Expression of prostaglandin synthesis pathway enzymes in the porcine corpus luteum during the oestrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology.* 2008;70:145-152.
71. Wasielak M, Głowacz M, Kamińska K, Waclawik A, Bogacki M. The influence of embryo presence on prostaglandins synthesis and prostaglandin E2 and F2alpha content in corpora lutea during periimplantation period in the pig. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:1208-1216.

72. Wilson ME, Fahrenkrug SC, Smith TPL, Rohrer GA, Ford SP. Differential expression of cyclooxygenase-2 around the time of elongation in the pig conceptus. *Anim Reprod Sci.* 2002;71:229-237.
73. Yurtcu N, Cetin A, Karadas B, Gonca Imir A, Kaya T, Erselcan T, Bagcivan I, Cetin M. Comparison of effects of formoterol and BRL 37344 on isolated term-pregnant rat myometrial strips in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2006;530:263-269.
74. Zięcik AJ, Waclawik A, Kaczmarek MM, Blitek A, Jalali BM, Andronowska A. Mechanisms for the establishment of pregnancy in the pig. *Reprod Dom Anim.* 2011;46:31-41.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Jeszcze przed rozpoczęciem studiów pracowałem przez rok jako uczestnik Studenckiego Ochotniczego Hufca Pracy w Katedrze Farmakologii na Wydziale Weterynaryjnym Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie i dobrze poznałem specyfikę wielogodzinnych, żmudnych badań na narządach izolowanych. Dlatego po ukończeniu studiów ówczesny Kierownik Katedry Prof. dr hab. Ireneusz Dynarowicz zaproponował mi zatrudnienie na etacie asystenta. W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora uczestniczyłem w licznych doświadczeniach prowadzonych w Katedrze oraz opanowałem techniki laboratoryjne i wnikliwie zapoznałem się z piśmiennictwem dotyczącym tematyki prowadzonych badań. Tematyka ta obejmowała określenie aktywności monoaminoooksydazy (MAO) w surowicy krwi krów oraz regulację przepływu krwi w naczyniach narządu rodowego świni. Efektem tej działalności był współdział w publikacjach. W pierwszej pracy, której jestem współautorem, opisano aktywność monoaminoooksydazy (MAO) i jej izoenzymów MAO-A i MAO-B w surowicy krów w okresie 10 dni od indukowanej kloprostenolem (syntetycznym analogiem PGF_{2α}) luteolizy ciała żółtego. Wykazano, że podanie kloprostenolu powoduje obniżenie aktywności całkowitej MAO, co było efektem obniżenia zarówno aktywności MAO-A jak i MAO-B. Ponadto wykazano, że aktywność MAO-B jest ponad dwukrotnie wyższa niż aktywność MAO-A, w związku z czym determinuje zmiany w całkowitej aktywności tego enzymu. Najsilniejsze hamowanie aktywności MAO obserwowano w 3-6 dniu od podania kloprostenolu, po czym aktywność enzymu wzrastała i

w 10 dniu była podobna do tej, którą mierzono przed podaniem czynnika luteolitycznego. W dalszych badaniach określano aktywność MAO i jej izoenzymów w surowicy krów w okresie okołoporodowym. Wykazano, że aktywność MAO gwałtownie wzrasta przed porodem. Ponadto aktywność MAO-B była istotnie wyższa niż aktywność MAO-A i podobnie jak u krów w cyklu rujowym determinowała całkowity profil aktywności MAO. Sugeruje to, że obserwowany przed porodem wzrost aktywności MAO może chronić przed gwałtownym wzrostem stężenia amin katecholowych we krwi.

Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

5.1.1. Dynarowicz I., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Janowski T., Raś A. (1997) *Aktywność monoaminooksydazy i jej izoenzymów A i B w surowicy krwi krów po zastosowaniu kloprostenolu w fazie lutealnej cyklu jajnikowego*. Acta Acad Agric Tech Olsten Veterinaria, 25:125-131. (MNiSW 0; IF 0)

5.1.2. Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Dynarowicz I., Janowski T., Zduńczyk S., Majewski M. (2000) *The activity of monoamine oxidase and its isoenzymes A and B in the bovine blood serum near the parturition*. Pol J Vet Sci, 3:187-190. (MNiSW 7; IF 0)

W tym okresie uczestniczyłem również w badaniach *in vitro* dotyczących wpływu C-końcowego fragmentu peptydu pochodnego genu kalcytoniny [Tyr^o]CGRP(28-37) na aktywność skurczową izolowanej tętnicy macicznej świni oraz interakcji tego peptydu z NA i ACh. Wykazano, że w przeciwieństwie do CGRP C-końcowy fragment [Tyr^o]CGRP(28-37) wywołuje (podobnie jak NA) skurcz izolowanej tętnicy macicznej świni; efekt skurczowy był silniejszy w tętnicy pobranej od świń w 1-2 dniu cyklu rujowego w porównaniu do 13-14 i 16-18 dnia cyklu. Ponadto wykazano, że NA potęgowała, podczas gdy ACh hamowała działanie peptydu. Synergiczne działanie [Tyr^o]CGRP(28-37) i NA było silniej wyrażone w tętnicy pobranej od świń w 13-14 dniu cyklu w porównaniu do 1-2 i 16-18 dnia cyklu. W dalszych badaniach wykazano, że zablokowanie receptorów α -adrenergicznych (podaniem fentolaminy) hamuje kurczący wpływ [Tyr^o]CGRP(28-37), natomiast zablokowanie receptorów β -adrenergicznych (podaniem propranololu) nie wpływa na działanie tego peptydu w tętnicy macicznej pobranej od świń w 17-18 dniu cyklu rujowego. Wykazano również, że podanie dezypraminy (inhibitora zwrotnego wychwytu NA) potęguje działanie [Tyr^o]CGRP(28-37), natomiast wcześniejsze podanie nifedypiny (blokującej kanały wapniowe) hamuje działanie peptydu. Sugeruje to, że działanie [Tyr^o]CGRP(28-37) na tętnicę

maciczną świni jest związane z uwalnianiem NA z zakończeń nerwowych jak również z zahamowaniem wychwytu zwrotnego NA i/lub stymulacją transportu jonów Ca^{2+} do mięśni gładkich tętnicy macicznej.

Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

- 5.1.3. Dynarowicz I., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.** (1999) *Interaction of the rat C-terminal fragment [Tyr⁰] CGRP (28-37) with noradrenaline and acetylcholine in isolated uterine artery of the pig.* Pol J Vet Sci, 2:71-75. (MNiSW 7; IF 0)
- 5.1.4. Dynarowicz I., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.** (1999) *Pharmacological analysis of vasoconstrictile action of the rat C-terminal fragment [Tyr⁰] CGRP (28-37) in isolated uterine artery of the pig.* Pol J Vet Sci, 2:77-80. (MNiSW 7; IF 0)

Ważne miejsce w moich zainteresowaniach naukowych zajęło zagadnienie dotyczące udziału NPY w regulacji napięcia tętnicy jajnikowej świni. W piśmiennictwie (w tamtym czasie) dostępne były informacje dotyczące wpływu NPY na kurczliwość tętnicy macicznej świnki morskiej i tętnicy jajnikowej królika. Natomiast nie było prac opisujących wpływ NPY na tętnicę jajnikową świni. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazano naczyniokurczący wpływ NPY oraz opisano interakcje tego peptydu z NA w działaniu na tętnicę jajnikową swni niedojrzałych płciowo oraz w różnych fazach cyklu rujowego. Ponadto wykazano, że NPY w warunkach *in vitro* oddziałuje na tętnicę jajnikową nie tylko poprzez receptory Y ale również receptory α_1 - i α_2 -adrenergiczne mogą być włączone w ten proces. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie następujących konkluzji: a) neuropeptyd Y powoduje skurcz izolowanej tętnicy jajnikowej świni a siła jego działania jest zależna od statusu hormonalnego; najsilniejszy wpływ naczyniokurczący po podaniu NPY obserwowano w 17-20 dniu cyklu jajnikowego, słabszy w 1-5 i 8-13 dniu cyklu i najmniejszy u zwierząt niedojrzałych płciowo, b) NPY potęguje naczyniokurczące działanie NA, c) naczyniokurczące działanie NPY może odbywać się poprzez receptory Y oraz receptory α -adrenergiczne, d) włókna D β H- i NPY-immunoergiczne są obecne w tętnicy jajnikowej swni niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Uzyskane wyniki wskazują, że NA i NPY, uwalniane lokalnie w tętnicy jajnikowej, mogą mieć istotny wpływ na napięcie ściany tego naczynia.

Wyniki powyższych badań przedstawiłem w rozprawie doktorskiej pt. „Analiza udziału neuropeptydu Y w regulacji przepływu krwi przez tętnicę jajnikową świni”, którą obroniłem 12.12.2001 r. na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-

Mazurskiego w Olsztynie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej przedstawiającej aktualny (na owe czasy) stan wiedzy w tym zakresie.

- 5.1.5. **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J., Barszczewska B., Sienkiewicz W. (2003) *Localisation of neuropeptide Y and norepinephrine in the porcine ovarian artery and their influence on local blood pressure*. Folia Histochem Cytobiol, 41:73-81. (MNiSW 10; IF 0,475)
- 5.1.6. **Markiewicz W.** (2003) *Alpha adrenergic receptors are involved in the contractile activity of neuropeptide Y in the porcine isolated ovarian artery*. Vet Med – Czech, 48:283-292. (MNiSW 27; IF 0,608)
- 5.1.7. **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J., Bossowska A., Majewski M. (2003) *NPY: its occurrence and relevance in the female reproductive system*. Folia Histochem Cytobiol, 41:183-192. (MNiSW 10; IF 0,475)

5.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych brałem czynny udział w badaniach związanych z regulacją przepływu krwi przez narząd rodny, funkcją wydzielniczą ciała żółtego oraz aktywnością skurczową mięśniówki gładkiej macicy, jajowodu i pęcherza moczowego. Włączyłem się również w badania z zakresu immunofarmakologii i farmakokinetyki.

5.2.1. Badania związane z regulacją przepływu krwi w układzie rozrodczym i funkcją wydzielniczą ciała żółtego

Celem kolejnych badań związanych z rolą CGRP w regulacji przepływu krwi przez narząd rodny świni było określenie wzoru unerwienia CGRP-ergicznego oraz określenie wpływu α -CGRP i C-końcowego fragmentu (Tyr27) α -CGRP(27-37) na ciśnienie perfuzyjne w izolowanej tętnicy jajnikowej świń w 8-13 dniu cyklu rujowego. W badaniach tych wykazano obecność włókien CGRP-ergiczných w tętnicy jajnikowej. Ponadto wykazano, że α -CGRP powoduje obniżenie ciśnienia perfuzyjnego w izolowanej tętnicy jajnikowej świni o 16%, podczas gdy (Tyr27) α -CGRP(27-37) o 13%. Sugeruje to, że CGRP, uwalniany z okołonaczyniowych zakończeń nerwowych, powoduje rozkurcz tętnicy jajnikowej, a siła tego działania jest zależna od długości łańcucha powstającego podczas dezaktywacji cząsteczki

przez proteazy tkankowe. W kolejnych badaniach określano wpływ CGRP na kurczliwość tętnicy macicznej świń niedojrzałych i dojrzałych płciowo w warunkach *in vivo* oraz badano interakcję pomiędzy [Tyr^o]CGRP(28-37) i CGRP w tętnicy macicznej świń dojrzałych płciowo. Wykazano, że CGRP powoduje istotne obniżenie ciśnienia krwi w tętnicy macicznej zarówno świń niedojrzałych jak i dojrzałych płciowo, co potwierdziło wcześniejsze wyniki badań *in vitro* wskazujące na naczyniorozszerzające działanie tego peptydu. Wykazano, również, że [Tyr^o]CGRP(28-37) nie wywoływał istotnych zmian w ciśnieniu oraz nie zmieniał istotnie naczyniorozkurczowego działania CGRP. Był to efekt odmienny od tego, który obserwowano w warunkach *in vitro*, co może wynikać z faktu, że w warunkach *in vivo* końcowy efekt działania badanej substancji jest wypadkową jej wpływu bezpośredniego jak również działania modulującego jednocześnie uwalnianych endogennych neuroprzekaźników i czynników endokrynych.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach:

5.2.1.1. **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J., Barszczewska B., Maślanka T., Majewski M. (2004) *The distribution and influence calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the perfusion pressure in the isolated ovarian artery in the pig*. Folia Morphol, 63:99-101. (MNiSW 5; IF 0)

5.2.1.2. Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Barszczewska B., Maślanka T., Chrostowska M., Janiuk J. (2006) *Wpływ peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) na przepływ krwi w tętnicy macicznej świni*. Med Weter, 62:1164-1166. (MNiSW 15; IF 0)

W kolejnych badaniach *in vivo* określano wpływ tlenku azotu (NO) na przepływ krwi w naczyniach macicznych świń w dniach 1-5, 8-13 i 17-20 cyklu rujowego. Wykazano, że stężenie azotynów i azotanów (odzwierciedlające poziom NO) było istotnie wyższe w żyłę macicznej w porównaniu do tętnicy macicznej w 1-5 dniu cyklu; niższe w tętnicy macicznej w porównaniu do żyły jajnikowej i macicznej oraz w tętnicy jajnikowej w porównaniu do żyły jajnikowej w 8-13 dniu cyklu; niższe w tętnicy macicznej w porównaniu do tętnicy jajnikowej oraz żyły jajnikowej i macicznej w 17-20 dniu cyklu rujowego. Wyniki te wskazują, że ilość uwalnianego NO w naczyniach macicznych jest zmienna w przebiegu cyklu rujowego. Ponadto wykazano, że podanie wysokiej dawki donora NO (nitroprusydku sodu) powoduje spadek, natomiast podanie inhibitora syntazy NO (esteru metyloвого N^o - nitro-L-argininy) nie wpływa istotnie na ciśnienie krwi w tętnicy macicznej świni. Nie

stwierdzono istotnych różnic w działaniu badanych substancji egzogennych pomiędzy poszczególnymi dniami cyklu.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

5.2.1.3. Barszczewska B., Jaroszewski J.J. **Markiewicz W.**, Maślanka T., Chrostowska M. (2005) *Influence of nitric oxide on the blood flow in the porcine uterine artery; an in vivo study*. Pol J Vet Sci, 8:195-200. (MNiSW 6; IF 0)

Celem kolejnych badań było wykazanie czy tlen (O₂) i NO są powiązane z gwałtownymi zmianami w funkcji ciała żółtego bydła podczas luteolizy. W badaniach tych określano stężenie progesteronu (P₄), azotynów i azotanów i ciśnienie parcjalne tlenu (pO₂) w trakcie luteolizy indukowanej dinoprostem, analogiem PGF_{2α}. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że podanie luteolitycznej dawki dinoprostu powoduje istotne obniżenie stężenia P₄ w żyły jajnikowej w ciągu 2 godz. od podania leku. Obniżenie stężenia P₄ było poprzedzone zwiększeniem stężenia azotynów i azotanów w żyły jajnikowej, żyły szyjnej zewnętrznej i tętnicy brzusznej. Podstawowe pO₂ było istotnie wyższe w żyły jajnikowej niż w żyły szyjnej zewnętrznej i ulegało zwiększeniu w żyły jajnikowej w 30-120 min od podania analogu PGF_{2α}. Uzyskane wyniki wskazują, że podanie dinoprostu indukuje gwałtowny wzrost pO₂ i NO w krążeniu jajnikowym i sugeruje, że O₂ i NO biorą udział we wczesnych etapach regresji ciała żółtego bydła, co w konsekwencji prowadzi do hamowania produkcji i wydzielania P₄.

Wyniki tych badań zostały opisane w pracy:

5.2.1.4. Acosta T.J., Bah M.M., Korzekwa A., Wocławek-Potocka I., **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J. Okuda K. Skarżyński D.J. (2009) *Acute changes in circulating concentrations of progesterone, nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis in cattle*. J Reprod Dev, 55:149-155. (MNiSW 20; IF 1,697)

W tym samym okresie badaliśmy również wpływ kwasu acetylosalicylowego, indometacyny, ibuprofenu, naproksenu, piroksyjamu, fenylobutazonu, metamizolu i nimesulidu (leków o różnym powinowactwie do cyklooksygenazy i różnej budowie chemicznej) na syntezę P₄ w komórkach lutealnych bydła. Wykazano, że kwas acetylosalicylowy i indometacyna nie wpływają istotnie na syntezę tego hormonu podczas gdy metamizol, piroksyjam, fenylobutazon, naproksen i ibuprofen istotnie stymulują a

nimesulid hamuje produkcję P₄. Sugeruje to, że większość niesteroidowych leków przeciwzapalnych może wpływać na syntezę P₄ w ciałku żółtym bydła, ale działanie to jest zależne od rodzaju zastosowanego leku.

Wyniki badań zostały opisane w pracy:

5.2.1.5. Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Maślanka T., Skarzyński D.J. (2009) *Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on progesterone production by cultured bovine luteal cells*. Pol J Vet Sci, 12:305-310. (MNiSW 15; IF 0,435)

Efektom prowadzonych badań była również publikacja pracy przeglądowej, w której opisano aktualny (na owe czasy) wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na funkcję wydzielniczą ciała żółtego.

5.2.1.6. Chrostowska M., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.** (2007) *Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na czynność ciała żółtego*. Med Weter, 63:635-637. (MNiSW 10; IF 0)

5.2.2. Badania związane z aktywnością skurczową mięśniówki gładkiej macicy, jajowodu i pęcherza moczowego

Brałem czynny udział w badaniach określających rolę prostanoidów i leukotreinów w aktywności skurczowej zapalnie zmienionej macicy świni, prowadzonych wspólnie z pracownikami Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

W pierwszym etapie badań określano wpływ NA, ACh oraz PGF_{2α} (stosowanej samodzielnie lub po wcześniejszym zastosowaniu blokerów receptorów EP₁, EP₂, EP₃ i EP₄ dla PGE₂) na kurczliwość ENDO/MYO i MYO świń zdrowych i z indukowanym stanem zapalnym macicy. Wykazano, że w macicy zwierząt zdrowych NA powoduje rozkurcz a ACh skurcz, podczas gdy w macicy zmienionej zapalnie obie substancje powodują silny skurcz. Również PGF_{2α} podana samodzielnie powodowała wzrost intensywności skurczów zarówno w macicy kontrolnej jak i zmienionej zapalnie. PGF_{2α} podana po wcześniejszym zablokowaniu receptorów EP₂ zwiększała aktywność skurczową MYO macicy kontrolnej, natomiast po zablokowaniu receptorów EP₄ w macicy kontrolnej i zmienionej zapalnie. PGF_{2α} podana po wcześniejszym zablokowaniu receptorów EP₁ i EP₃ obniżała lub nie zmieniała intensywności skurczów w macicy kontrolnej i zmienionej zapalnie. Uzyskane wyniki badań wskazują, że PGF_{2α} może wpływać na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej macicy

bezpośrednio, poprzez własne receptory, ale może również oddziaływać na receptory dla PGE₂. Ponadto wykazano, że stan zapalny może powodować zmiany w odpowiedzi na stymulację adrenergiczną.

W dalszych badaniach wykazano, że PGE₂ zwiększa intensywność skurczów w macicy kontrolnej ale zmniejsza w macicy zmienionej zapalnie. Podanie PGE₂ po wcześniejszym zablokowaniu receptorów EP₂ powodowało wzrost intensywności skurczów MYO macicy zmienionej zapalnie. Podobną reakcję obserwowano w ENDO/MYO po zablokowaniu receptorów EP₄. Z kolei podanie PGE₂ po wcześniejszym zablokowaniu receptorów EP₁ prowadziło do zmniejszenia intensywności skurczów w macicy zmienionej zapalnie, podczas gdy zablokowanie receptorów EP₃ powodowało taki efekt w MYO macicy kontrolnej. Uzyskane wyniki wskazują po raz pierwszy, że PGE₂ (poprzez wpływ na receptory EP₂ i EP₄) zmniejsza intensywność skurczów macicy zmienionej zapalnie, co może mieć istotne znaczenie dla przebiegu procesu patologicznego w tym narządzie.

W dalszych badaniach określano: a) stężenie prostacykliny (PGI₂) w krwi obwodowej, wypłuczynach ze światła macicy oraz ENDO i MYO, b) ekspresję białek dla syntazy PGI (PTGIS) i receptora prostacyklinowego (PTGIR) oraz c) komórkową lokalizację PTGIS i PTGIR w macicy świni z indukowanym przez *E. coli* stanem zapalnym. Ponadto, badano wpływ PGI₂ na aktywność skurczową ENDO/MYO i MYO. Wykazano po raz pierwszy, że stan zapalny macicy prowadzi do wzrostu stężenia PGI₂ w ENDO, MYO i świetle macicy oraz zwiększa ekspresję PTGIS w 8 i 16 oraz PTGIR w 16 dniu od wywołania stanu zapalnego. Wykazano również, że w macicy objętej stanem zapalnym PGI₂ zwiększa intensywność skurczów mięśniówki gładkiej. Sugeruje, że w zmienionej zapalnie macicy zwiększona synteza PGI₂ może prowadzić do zwiększenia aktywności skurczowej macicy, co w konsekwencji może mieć wpływ na przebieg procesu zapalnego.

W kolejnych badaniach określano wpływ leukotrienu C₄ (LTC₄) i D₄ (LTD₄) na aktywność skurczową zapalnie zmienionej macicy świni. Wykazano, że w 8 dniu od zakażenia LTC₄ zwiększał intensywność skurczów ENDO/MYO i w mniejszym stopniu MYO oraz zmniejszał częstotliwość skurczów. Z kolei w 16 dniu od zakażenia LTC₄ zmniejszał zarówno intensywność jak i częstotliwość skurczów. Z kolei LTD₄ zwiększał intensywność skurczów i zmniejszał częstotliwość w 8 i 16 dniu od zakażenia. Sugeruje to, że LTC₄, może być odpowiedzialny za zmniejszoną kurczliwość macicy w stanie zapalnym.

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w publikacjach:

- 5.2.2.1. Kucharski J., Jaroszewski J.J., Jana B., Górską J., Kozłowska A., **Markiewicz W.** (2007) *The influence of inflammatory process on prostaglandin F_{2α} contractile activity in porcine uterus.* J Anim Feed Sci, 16:654-667. (MNiSW 15; IF 0,386)
- 5.2.2.2. Jana B., Jaroszewski J.J., Kucharski J., Koszykowska M., Górską J., **Markiewicz W.** (2010) *Participation of prostaglandin E₂ in contractile activity of inflamed porcine uterus.* Acta Vet Brno, 79:249-259. (MNiSW 27; IF 0,534)
- 5.2.2.3. Jana B., Jaroszewski J.J., Czarzasta J., Włodarczyk M., **Markiewicz W.** (2013) *Synthesis of prostacyclin and its effect on the contractile activity of the inflamed porcine uterus.* Theriogenology, 79:470-485. (MNiSW 35; IF 1,845)
- 5.2.2.4. Jana B., Jaroszewski J.J., Czarzasta J., **Markiewicz W.** (2015) *The influence of leukotrienes C₄ and D₄ on the contractility of the inflamed porcine uterus.* Theriogenology, 83:1328-1337. (MNiSW 30; IF 1,838)

W tym samym czasie współuczestniczyłem w badaniach, których celem było określenie roli kwasu lizofosfatydowego (LPA) i jego receptorów LPA₁, LPA₂ i LPA₃ w aktywności skurczowej macicy świni w okresie około-implantacyjnym. W badaniach tych wykazano, że analog LPA oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (L-α-LPA), agonista receptorów LPA₁ i LPA₂ zwiększa aktywność skurczową skrawków ENDO/MYO pobranych z rogu macicy z rozwijającymi się zarodkami, ale nie wpływa na kurczliwość mięśniówki macicy w rogu bez zarodków. Analog receptora LPA₃, 1-oleoyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphothionate (OMPT) zwiększał aktywność skurczową w skrawkach ENDO/MYO pobranych z rogów macicy z zarodkami i bez zarodków oraz w skrawkach MYO pobranych z rogów macicy z zarodkami. Sugeruje to, że aktywacja receptorów LPA₁ i LPA₂ jest możliwa tylko w obecności zarodków. Natomiast OMPT działa raczej przez receptor LPA₃ i działanie to jest bardziej widoczne w macicy świń ciężarnych niż cyklicznych. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę receptorów LPA₁, LPA₂ i LPA₃ w aktywności skurczowej macicy świń we wczesnej ciąży.

Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 5.2.2.5. **Markiewicz W.**, Kamińska K., Bogacki M., Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2012) *Participation of analogues of lysophosphatidic acid (LPA): oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (L-alpha-LPA) and 1-oleoyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphothionate*

(OMPT) in uterine smooth muscle contractility of the pregnant pigs. Pol J Vet Sci, 15:635-643. (MNiSW 20; IF 0,570)

Brałem również udział w badaniach, w których określano ekspresję białka i transkrypcję mRNA dla różnych różnych izoform syntazy NO (NOS; śródbłonkowej - eNOS, indukowanej – iNOS i nerwowej - nNOS) oraz wpływ NO na kurczliwość jajowodu była w 2-3, 5-6, 15-17 i 19-21 dniu cyklu rujowego. Wyniki uzyskane z zastosowaniem różnych metod (immunohistochemicznej, Rt-PCR i Western blot) wykazały obecność NOS w jajowodzie była, jakkolwiek aktywność poszczególnych izoform była zależna od fazy cyklu i różniła się w poszczególnych strukturach jajowodu. Również zmiany w aktywności skurczowej po podaniu donorów NO (L-argininy i nitroprusydku sodu) i inhibitora NOS (esteru metylowego N^o -nitro-L-argininy) były zależne od fazy cyklu i miejsca pobrania tkanki (bańka lub cieśń jajowodu). Uzyskane wyniki wskazują, że zależne of fazy cyklu rujowego zmiany w uwalnianiu endogennego NO w jajowodzie mogą mieć istotne znaczenie dla transportu gamet i zarodka/ów.

Wyniki tych badań zostały opisane w pracy:

5.2.2.6. Yilmaz O., Całka J., Bukowski R., Załęcki M., Wąsowicz K., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Bulbul A., Ucar M. (2012) *Nitric oxide in the bovine oviduct: Influence on contractile activity and nitric oxide synthase isoforms localization.* Theriogenology, 77:1312-1327. (MNiSW 35; IF 2,082)

W ostatnich latach brałem również czynny udział (wspólnie z pracownikami Katedry Fizjologii Człowieka Wydziału Nauk Medycznych UW-M w Olsztynie) w badaniach określających wpływ doksazosyny na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej pęcherza moczowego świni oraz wpływ toksyny botulinowej (BTX) i resiniferatoksyny (RTX) na plastyczność neuronów pnia współczulnego zaopatrujących pęcherz moczowy świni.

W pierwszych badaniach określano *in vitro* wpływ ACh, NA i 5-hydroksytryptaminy (5-HT) na kurczliwość pęcherza moczowego świń niedojrzałych płciowo, którym przez 30 dni podawano doksazozynę (grupę kontrolną stanowiły zwierzęta otrzymujące placebo). Wykazano, że ACh i 5-HT w mniejszym stopniu zwiększają napięcie mięśni gładkich w grupie otrzymującej doksazozynę niż w grupie kontrolnej. Z kolei NA w większym stopniu obniżała napięcie w mięśniówce grupy kontrolnej niż w grupie otrzymującej doksazozynę. Uzyskane wyniki sugerują, że długotrwałe stosowanie doksazozyny prowadzi do

desensytacji mięśni gładkich wypieracza wobec mediatorów układu współczulnego i przywspółczulnego.

W kolejnych badaniach określano neurochemiczną charakterystykę immunoreaktywnych neuronów sensorycznych dla substancji P (SP-IR) dających projekcję do pęcherza moczowego świń, którym do ściany pęcherza moczowego wstrzyknięto BTX typu A. Uzyskane wyniki wykazały, że BTX powoduje zmniejszenie liczby komórek SP-IR zawierających CGRP, somatostatynę lub kalbindynę oraz wzrost ilości komórek nerwowych zawierających galaninę. Wyniki te wskazują, że BTX zmienia istotnie kodowanie chemiczne w SP-IR zaopatrujących pęcherz moczowy świni.

Celem dalszych badań było: a) ustalenie rozmieszczenia i właściwości immunohistochemicznych neuronów zwoju kręzkowego tylnego dających projekcję do pęcherza moczowego samicy świni domowej, b) poszerzenie bieżącego stanu wiedzy na temat oddziaływania RTX na unerwienie współczulne tego narządu. Otrzymane wyniki potwierdzają, że zwój kręzkowy tylny jest ważnym źródłem autonomicznego unerwienia pęcherza moczowego loszek. Wykazano, że podanie RTX do pęcherza moczowego prowadzi do głębokich zmian w zakresie właściwości immunohistochemicznych neuronów zwoju kręzkowego tylnego dających projekcję do pęcherza moczowego świni. Nastąpiło wyraźne zmniejszenie liczby neuronów FB⁺/TH⁺ immunopozytywnych dla NPY i naczynioaktywnego peptydu jelitowego, natomiast zwiększenie liczby komórek nerwowych FB⁺/TH⁺ immunopozytywnych dla somatostatyny, kalbindyny, galaniny i nNOS. Uzyskane wyniki wskazują, że podawanie RTX wpływa nie tylko na unerwienie czuciowe ale również współczulne, co powinno być brane pod uwagę przed rozpoczęciem leczenia z zastosowaniem tej toksyny.

Wyniki powyższych badań przedstawiono w pracach:

- 5.2.2.7. **Markiewicz W.**, Jasiocka A., Janiuk J., Bossowska A., Jaroszewski J.J. (2014) *The influence of doxazosin, an α_1 -adrenergic receptor antagonist on the urinary bladder contractility in pigs*. Pol J Vet Sci, 17:527-529. (MNiSW 20; IF 0,712)
- 5.2.2.8. Bossowska A., Lepiarczyk E., Mazur U., Janikiewicz P., **Markiewicz W.** (2015). *Botulinum toxin type A induces changes in the chemical coding of substance P - immunoreactive dorsal root ganglia sensory neurons supplying the porcine urinary bladder*. Toxins, 7:4797-4816. (MNiSW 30; IF 2,938)

5.2.2.9. Lepiarczyk E., Dudek A., Kaleczyc J., Majewski M., **Markiewicz W.**, Radziszewski P., Bossowska A. (2016) *The influence of resiniferatoxin on the chemical coding of caudal mesenteric ganglion neurons supplying the urinary bladder in the pig.* J Physiol Pharmacol, 67:625-632. (MNiSW 25; IF 2,386)

5.2.3. Badania z zakresu immunofarmakologii

Uczestniczyłem również w badaniach z zakresu immunofarmakologii realizowanych w rodzimej Katedrze. Pierwsze z tych badań dotyczyły wpływu pojedynczej i podwójnej iniekcji meloksykamu na nieswoiste komórkowe (aktywność wybuchu tlenowego, zdolność wewnątrzkomórkowego zabijania PKA przez komórki żerne, odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowanych mitogenami: konkawaliną, lipopolisacharydem i fitohemaglutyniną) i humoralne (aktywność lizozymu, poziom ceruloplazminy, białka ogólnego i gammaglobulin) mechanizmy obronne u bydła. W obu badaniach obserwowano mniej lub bardziej widoczne zmiany w wartościach badanych parametrów, jakkolwiek w przypadku odporności humoralnej meloksykam prowadził do istotnego obniżenia poziomu gammaglobulin w surowicy.

Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

5.2.3.1. Wójcik R., **Markiewicz W.**, Małaczewska J., Chrostowska M., Maślanka T., Rotkiewicz Z., Jaroszewski J.J., Siwicki J.K. (2006) *Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła.* Med Weter, 62:1400-1402. (MNiSW 15; IF 0)

5.2.3.2. **Markiewicz W.**, Wójcik R., Małaczewska J., Ziółkowski H., Jaroszewski J.J., Siwicki A.K. (2011) *Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła w fazie lutealnej cyklu rujowego.* Med Weter, 67:478-482. (MNiSW 15; IF 0,435)

Kolejne badanie dotyczyło charakterystyki fenotypowej i czynnościowej limfocytów T WC1⁺ bydła. W badaniach tych ustalono m.in., że zarówno w obrębie subpopulacji CD25⁻ WC1⁺, jak i CD25⁺ WC1⁺, komórki produkujące IFN- γ i IL-10 stanowiły w dominującej mierze odrębne subpopulacje. Stwierdzono ponadto dodatnią korelację między obecnością cząsteczki CD25 (łańcuch α receptora dla IL-2) na limfocytach T WC1⁺ a produkcją IL-10 i TGF- β . Uzyskane wyniki wskazują, że pod względem produkcji IFN- γ , IL-10 i TGF- β ,

limfocyty T CD25⁺WC1⁺ okazują się mieć bardziej supresorowy profil niż komórki o fenotypie CD25⁻WC1⁺.

Wyniki tych badań opisano w pracy:

- 5.2.3.3. Maślanka T., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Ziółkowski H., Barski D. (2012) *The presence of CD25 on bovine WC1⁺ γδ T cells is positively correlated with their production of IL-10 and TGF-β, but not IFN-γ.* Pol J Vet Sci, 15:11-20. (MNiSW 20; IF 0,570)

W dalszych badaniach określano wpływ deksametazonu i meloksykamu na limfocyty T CD8⁺ bydła. Stwierdzono w nich, że deksametazon indukował szybko występujący i trwały ubytek limfocytów T CD25⁻CD8⁺. Było to przede wszystkim wynikiem proapoptotycznego działania deksametazonu wobec tych komórek. Ponadto, deksametazon przejściowo zwiększał względną i bezwzględną liczbę komórek CD25^{high}CD8⁺ i CD25^{low}CD8⁺. Efekt ten nie był następstwem zwiększonej proliferacji, lecz przynajmniej częściowo wynikał z antyapoptotycznego działania leku wobec tych komórek. Uzyskane wyniki wskazują, że indukcja ubytku limfocytów CD8⁺ oraz upośledzenie produkcji IFN-γ biorą udział w tworzeniu przeciwwzapalnego i immunosupresyjnego działania deksametazonu u bydła. Stwierdzono ponadto, że w wywoływanie tych efektów nie jest zaangażowane zwiększenie ekspresji Foxp3, bądź wzrost produkcji IL-10 i TGF-β przez limfocyty CD8⁺. Meloksykam nie wpływał znacząco na limfocyty CD8⁺ w zakresie ich odsetka, liczby bezwzględnej, apoptozy, proliferacji, ekspresji Foxp3 oraz produkcji IFN-γ, IL-10 i TGF-β.

Wyniki tych badań opisano w pracy:

- 5.2.3.4. Maślanka T., Jaroszewski J.J., **Markiewicz W.**, Jasiocka A., Ziółkowski H., Jędrzkiewicz D. (2013). *Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁻CD8⁺ T cells – in vitro study.* Res Vet Sci, 94:662-674. (MNiSW 35; IF 1,511)

Następne badania dotyczyły wpływu PGE₂, (fizjologicznego autakoidu oraz mediatora prozapalnego) na funkcję limfocytów T i komórek NK bydła. W badaniach tych wykazano, że PGE₂ zmniejsza ekspresję CD25 na limfocytach T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ bydła, a selektywna blokada receptora EP₄, ale nie EP₁ i EP₃, zapobiegała temu efektowi. Dowodzi to, że PGE₂ reguluje w dół ekspresję CD25 za pośrednictwem receptora EP₄. Nieoczekiwanie stwierdzono, że ekspozycja badanych komórek na selektywnego agonistę receptora EP₂

prowadziła do wzrostu ekspresji CD25 na ich powierzchni. Wyniki te wskazują, że pod względem wpływu PGE₂ na ekspresję CD25 na limfocytach T była receptor EP₄ służy jako receptor hamujący, podczas gdy receptor EP₂ pełni funkcję receptora pobudzającego.

Wyniki tych badań opublikowano w pracy:

5.2.3.5. Maślanka T., Spodniewska A., Barski D., Jasiocka A., Zuśka-Prot M., Ziółkowski H., **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J. (2014) *Prostaglandin E2 down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor*. *Vet Immunol Immunopathol*, 160:192-200. (MNiSW 30; IF 1,748)

W kolejnych badaniach wykazano, że PGE₂ może upośledzać proliferację bydlęcych komórek NK oraz indukować ich apoptozę; pierwszy z tych efektów jest wywierany za pośrednictwem receptora EP₄, podczas gdy w wywołaniu drugiego nie pośredniczą receptory EP (czyli receptory dla PGE₂), a więc najprawdopodobniej ma on charakter pośredni. Wyniki wzmiankowanych badań wskazują, że: a) proapoptotyczne i antyproliferacyjne działanie PGE₂ najwyraźniej nie występuje przy jej fizjologicznym poziomie, natomiast może mieć miejsce w trakcie reakcji zapalnej, b) występowanie i natężenie proapoptotycznego działania PGE₂ jest zależne od jej stężenia. Uzyskane wyniki sugerują, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych u zwierząt z zakażeniami wirusowymi może chronić komórki NK przed indukowanymi przez PGE₂ apoptozą oraz upośledzeniem proliferacji.

Rezultaty tych badań opublikowano w pracy:

5.2.3.6. Maślanka T., Chrostowska M., Otrocka-Domagala I., Snarska A., Mikiewicz M., Zuśka-Prot M., Jasiocka A., Ziółkowski H., **Markiewicz W.**, Jaroszewski J.J. (2016) *Prostaglandin E2 exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells*. *Res Vet Sci*, 107:80-87. (MNiSW 30; IF 1,504)

5.2.4. Badania z zakresu farmakokinetyki

Brałem czynny udział w badaniach, w których określano farmakokinetykę fluniksyny, albendazolu i enrofloksacyny.

Pierwsze z tych badań dotyczyły określenia farmakokinetyki fluniksyny i jej metabolitu (5-hydroksyfluniksyny) u dojrzałych płciowo jałówek po podaniu 1 i 4 dawki leku w odstępie 24 godz. Wykazano, że wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych (m.in. wielkość pola pod krzywą, półokres fazy absorpcji, półokres fazy

eliminacji, klirens, średni czas przebywania leku) nie różnią się istotnie w 1 i 4 dniu, co wskazuje, że nie dochodzi do kumulacji leku. Ponadto wykazano, że lek ulega bardzo szybkiej dystrybucji do tkanek.

Wyniki badań opisano w pracy:

- 5.2.4.1. Jaroszewski J.J., Jedziniak P., **Markiewicz W.**, Grabowski T., Chrostowska M., Szprengier-Juszkiewicz T. (2008) *Pharmacokinetics of flunixin in mature heifers following multiple intravenous administration*. Pol J Vet Sci, 3:199-203. (MNiSW 15; IF 0,465)

Celem kolejnych badań było: a) opracowanie metody oznaczania albandazolu (ALB) i jego metabolitów: albandazolu sulfotlenku (SOX) i albandazolu sulfonu (SON) z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z detekcją fluorescencyjną, b) porównanie kolumn HPLC z kolumnami ultraciśnieniowymi (UPLC), c) określenie farmakokinetyki ALB i jego metabolitów w osoczu indyków. Opracowana metoda spełniła kryteria walidacyjne i może być wykorzystywana do analizy stężeń ALB i jego metabolitów. Ponadto wykazano, że zastosowanie kolumn UPLC pozwala na uzyskanie wyższych pików w porównaniu do kolumn HPLC z jednoczesnym zachowaniem wysokiej jakości oznaczeń oraz pozwala na 5-10-krotną redukcję fazy ruchomej. Parametry farmakokinetyczne wyznaczone w oparciu o analizę oznaczonych stężeń ALB i jego metabolitów wskazują na szybką eliminację substancji macierzystej. Średni czas pozostawania SON w organizmie był ponad 2-krotnie dłuższy w porównaniu do SOX i ponad 4-krotnie dłuższy w porównaniu do ALB. Półokres eliminacji wynosił <1 godz. dla ALB, >5 godz. dla SOX i > 9 godz. dla SON. Uzyskane wyniki wskazują, że opracowana pozwala na precyzyjne oznaczanie ALB i jego metabolitów a zastosowanie kolumn UPLC zwiększa istotnie czułość metody.

Wyniki badań opisano w pracy:

- 5.2.4.2. Grabowski T., Jaroszewski J.J., Świerczewska A., Sawicka R., Maślanka T., **Markiewicz W.**, Ziółkowski H. (2010) *Application of ultra performance columns in high performance liquid chromatography for albandazole and its metabolites determination in turkeys*. Biomed Chromatogr, 25:1159-1167. (MNiSW 27; IF 1,545)

Celem kolejnych badań było opracowanie metodyki oznaczania enrofloksacyny w osoczu kurcząt brojlerów z zastosowaniem HPLC z detekcją fluorescencyjną. W efekcie prowadzonych badań opracowano metodykę, która wykazywała liniowość w zakresie 0,2-3,5 µg/ml, limit detekcji na poziomie 40 ng/ml i limit oznaczalności na poziomie 120 ng/ml, odzysk w granicach 90,07±0,89% i spełniła kryteria walidacyjne. Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia stężeń enrofloksacyny w osoczu kurcząt brojlerów po dożylnym podaniu leku. Wykazano, że stężenie enrofloksacyny ulega zmniejszeniu z 4,17 µg/ml w 5 min do 0,32 µg/ml w 24 godz. po podaniu leku. W oparciu o uzyskane dane dotyczące zależności stężenia-czas obliczono również główne parametry farmakokinetyczne. Wyniki badań opisano w pracy:

5.2.4.3. Jakubowski P., Jaroszewski J.J., Grabowski T., **Markiewicz W.**, Maślanka T. (2010) *Determination of enrofloxacin in chicken plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic study*. Acta Vet-Beograd, 60:563-572. (MNiSW 13; IF 0,169)

Celem dalszych badań było określenie wpływu paszy i jonów metali na wchłanianie enrofloksacyny z przewodu pokarmowego indyków. Wykazano, że biodostępność enrofloksacyny u ptaków z ograniczonym dostępem do paszy wynosi ok. 80% i ulega istotnemu obniżeniu w obecności jonów wapnia i magnezu (65,78±7,81%) oraz paszy (47,99±9,48%). Ponadto wykazano, że obecność paszy istotnie wydłuża czas osiągnięcia stężenia maksymalnego we krwi (do 8,06±3,08 godz.). Uzyskane wyniki badań wskazują, że pasza i jony metali mogą w istotny sposób wpływać na farmakokinetykę enrofloksacyny u indyków, a wykonana analiza farmakokinetyczna/farmakodynamiczna (PK/PD) potwierdza, że może to ograniczyć skuteczność terapeutyczną tego leku w stosunku do niektórych patogenów odpowiedzialnych za infekcje bakteryjne u drobiu.

Wyniki opisano w pracy:

5.2.4.4. Ziółkowski H., Jaroszewski J.J., Maślanka T., Grabowski T., Katolik K., Pawęska J., Siemianowska M., Jasiocka A., **Markiewicz W.**, Spodniewska A. (2014) *Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics*. Res Vet Sci, 97: 99-104. (MNiSW 35; IF 1,774)

5.3. Publikacje przeglądowe

- 5.3.1. Barszczewska B., Jaroszewski JJ., **Markiewicz W.** (2002) *Zasady zapisywania leków na receptcie*. *Życie Wet*, 77:318-320. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.2. **Markiewicz W.**, Jaroszewski JJ., Barszczewska B. (2003) *Co warto wiedzieć o homeopatii i homotoksykologii*. *Życie Wet*, 78:454:457. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.3. **Markiewicz W.**, Chrostowska M. (2004) *Leczenie ran u zwierząt środkami roślinnymi w przeszłości a obecnie*. *Życie Wet*, 79:627:629. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.4. **Markiewicz W.**, Barski D., Burmańczuk A., Tomaszewska E. (2014) *Toxicity of salinomycin and narasin in turkeys*. *J Elem*, 3:903-914. (MNiSW 15; IF 0,690)
- 5.3.5. Burmańczuk A., Roliński Z., Kowalski C., Burmańczuk N., **Markiewicz W.** (2015). *Possibilities of using the natural zeolites in animals production and environment protection*. *J Elem*, 20:803-811. (MNiSW 15; IF 0,719)

6. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego (dotyczy tylko publikacji pełnotekstowych)

6.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego uwzględniające rodzaj publikacji, listę MNiSW oraz współczynnik wpływu (IF)

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF
Prace oryginalne w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW) (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	26 (3)	629 (90)	32,032 (3,963)
Prace oryginalne w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	8	66	-
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW) (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	2 -	25 -	1,165 -
Prace przeglądowe w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	4	10	-
Łącznie	40	740	33,197

- Punktację MNiSW podano według komunikatu MNiSW obowiązującego dla roku publikacji.

- Współczynnik wpływu (IF) podano dla roku, w którym opublikowano pracę.

8. Pozostałe dane bibliograficzne

Liczba cytowań według Web of Science: **107**

Indeks Hirscha według Web of Science: **5**

6, 03, 2017

Włodzimierz Markiewicz