

Autoreferat

Dr n. wet. Iwona Otrocka-Domagala

*Katedra Anatomii Patologicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski*

Olsztyn 2019

1. Imię i nazwisko

Iwona Otrocka-Domagala

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

2002 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie patomorfologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ koenzymu Q10 i witaminy E na regenerację mięśni szkieletowych u świń*”,

1998 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.05.2014 do chwili obecnej Kierownik, Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

01.10.2004 do chwili obecnej Adiunkt, Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

01.06.2002 – 31.09.2004 Asystent, Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

01.04.1998 – 31.03.2002 Doktorant, Katedra Anatomii Patologicznej, 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. z 2017r. poz. 1789 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Badania nad przebiegiem pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych w warunkach ekspozycji na działanie wybranych czynników o właściwościach miotoksycznych i mioprotekcyjnych”

Osiągnięcie stanowi cykl trzech oryginalnych publikacji powiązanych tematycznie:

4.1.1. Otrocka-Domagala I.*, Mikołajczyk A., Paździor-Czapula K., Gesek M., Rotkiewicz T., Mikiewicz M. (2015) *Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post injury regeneration in pigs*. Pol. J. Vet. Sci. 18: 523-531. (MNiSW₂₀₁₅ 20, IF₂₀₁₅ 0,719)

Mój wkład w powstawanie tej publikacji polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej, wykonaniu części doświadczalnej i współtworzeniu hipotez naukowych. Odegrałam także pierwszoplanową rolę w przygotowaniu manuskryptu do publikacji, koncepcyjnym przygotowaniu przeprowadzonych badań, analizie uzyskanych danych i sformułowaniu wniosków. Mój udział procentowy w powstawanie tej publikacji szacuję na 65%.

* autor korespondencyjny

4.1.2. Otrocka-Domagala I.*, Paździor-Czapula K., Maślanka T. (2018) *Simvastatin impairs the inflammatory and repair phases of the postinjury skeletal muscle regeneration*. Biomed. Res. Int. 2018:7617312. (MNiSW₂₀₁₆ 25, IF₂₀₁₇ 2,583)

Mój wkład w powstawanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, wykonaniu barwień histopatologicznych i immunohistochemicznych, dokonaniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, sformułowaniu wniosków, oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy w powstawanie tej publikacji szacuję na 90%.

* autor korespondencyjny

4.1.3. Otrocka-Domagala I.*, Paździor-Czapula K., Gesek M. (2019) *Dexamethasone-induced impairment of post-injury skeletal muscle regeneration*. BMC Vet. Res. 15: 56. (MNiSW₂₀₁₆ 40, IF₂₀₁₇ 1,958)

Mój wkład w powstawanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, wykonaniu barwień histopatologicznych i immunohistochemicznych, dokonaniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników,

sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy w powstawaniu tej publikacji szacuję na **90%**.

* autor korespondencyjny

Łączny współczynnik wpływu IF prac wchodzących w skład zgłaszanego cyklu publikacji (dla prac opublikowanych w roku 2018 i 2019 przyjęto wskaźnik z roku 2017) wynosi: **5,26** a suma punktów wg listy czasopism punktowanych MNiSW (dla prac opublikowanych w roku 2018 i 2019 przyjęto ostatnią punktację czasopism, tj. z roku 2016) wynosi: **85**.

Ekspertyzy prowadzone w ramach badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe finansowano z tematu statutowego nr 15.610.006-300. Koszty publikacji dwóch prac (4.1.2., 4.1.3.) 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 do zagadnienia dotyczącego przeprowadzonych badań oraz ich uzasadnienie i cel naukowy

Mięśnie szkieletowe zbudowane są z wielojądrzastych, terminalnie zróżnicowanych włókien poprzecznie prążkowanych, które jako komórki pomiotyczne całkowicie utraciły zdolność do podziału i regeneracji [100]. Jednak dzięki puli jednojądrzastych komórek satelitarnych, znajdujących się w fazie spoczynku (G_0), zlokalizowanych pomiędzy sarkolemą a błoną podstawną terminalnie zróżnicowanych miocytów, włókna mięśniowe w okresie postnatalnym mają zdolność do odtworzenia swojej struktury z zachowaniem integralności tkanki w przypadku działania czynników uszkodzających [56]. Komórki satelitarne są aktywowane przez liczne bodźce, w tym obciążenie mechaniczne, stres oksydacyjny, czynniki hormonalne i czynniki zapalne. Aktywacji ulegają nie tylko komórki satelitarne w miejscu zadziałania czynnika uszkodzającego, ale również wszystkie leżące wzdłuż włókna mięśniowego, i dalej migrując lokalizują się w miejscu uszkodzenia [100]. Po aktywacji komórki satelitarne przechodzą z fazy G_0 poprzez fazę G_1 do syntezy DNA (faza S) i podziału mitotycznego, dając początek nowej populacji miogenicznych komórek prekursorowych (ang. Myogenic Precursor Cells, MPCs) których część podlega dalszym podziałom i różnicowaniu, część natomiast wraca do puli komórek spoczynkowych. Dobrze zróżnicowane komórki

miogeniczne (mioblasty) ulegają dalej fuzji z wytworzeniem wielojądrzastych miotub lub łączą się z uszkodzonym segmentem włókna mięśniowego [56]. Miotuby dalej dojrzewają, ulegają wydłużeniu, w ich cytoplazmie wzrasta ilość pęczków włókien mięśniowych z tworzeniem wyraźnego wzoru sarkomerycznego, a ich jądra komórkowe, początkowo ułożone centralnie, zaczynają migrować w kierunku sarkolemy i w ten sposób powstają młode włókna mięśniowe. Aktywowane MPCs wykazują między innymi silną jądrową ekspresję białka MyoD1 oraz miogeniny, a następnie podczas procesu dojrzewania i pojawienia się w ich cytoplazmie włókienek desminowych wykazują także cytoplazmatyczną ekspresję desminy [39, 108]. Desmina, jako główne białko pośrednie stabilizujące strukturę sarkomeryczną miocytów, występuje także w cytoplazmie miotub, początkowo w formie rozproszonej, a w miarę ich dojrzewania oraz w młodych włóknach przyjmuje wzór bardziej regularny, odpowiadający wzorowi sarkomerycznemu [44].

Pouszkodzeniowa regeneracja mięśni szkieletowych jest procesem złożonym, zsynchronizowanym, wymagającym zaangażowania nie tylko MPCs, tj. komórek satelitarnych i mioblastów, ale także komórek zapalnych. Pierwszym etapem regeneracji jest faza zapalna, bardzo ważna dla rekonstrukcji mięśni, charakteryzująca się martwicą włókien mięśniowych, wynaczynieniem oraz naciekiem komórek zapalnych [100, 103]. Faza ta zależy od sekrecji cytokin, chemokin i czynników wzrostu w miejscu uszkodzenia mięśni i towarzyszy jej naciekanie neutrofilii, następnie makrofagów prozapalnych (M1), zastępowanych dalej populacją makrofagów przeciwzapalnych, nefagocytujących (M2) [100, 103]. Wzajemne interakcje poszczególnych populacji komórkowych są kluczowe dla prawidłowego przebiegu tej fazy. Neutrofile są pierwszymi komórkami zapalnymi, które pojawiają się w miejscu uszkodzenia włókien mięśniowych, a największy wzrost ich liczby obserwuje się 12-24 godziny po urazie [100]. Komórki te inicjują cytolityczną i fagocytarną zdolność makrofagów M1, które zwykle najliczniejsze są w drugim dniu po uszkodzeniu, a których głównym zadaniem jest usuwanie resztek uszkodzonych miocytów [100]. Następnie makrofagi M1 zastępowane są populacją makrofagów M2, które osiągają szczyt swojej aktywności około czterech dni po urazie, ale pozostają jeszcze dość liczne przez kolejne dni regeneracji. Główną rolą makrofagów M2 jest wyciszenie procesu zapalnego [100]. Drugim, ważnym etapem regeneracji mięśni szkieletowych jest faza naprawy, którą charakteryzuje aktywacja, migracja, proliferacja i różnicowanie MPCs oraz ich fuzja z wytworzeniem miotub i młodych włókien mięśniowych [42, 100]. Faza ta ściśle związana jest z pierwszą fazą na poziomie komórkowym i molekularnym, ponieważ komórki zapalne, fibroblasty i macierz zewnątrzkomórkowa uszkodzonych tkanek uwalniają sygnały chemotaktyczne, które aktywują proliferację i

wczesne różnicowanie MPCs [100, 103]. Szczególną rolę odgrywają tu obie populacje makrofagów. Wykazano bowiem, że makrofagi M2 są kluczowe dla rekrutacji, proliferacji i różnicowania MPCs oraz promocji fazy naprawy, a makrofagi M1 regulują proliferację i wczesne różnicowanie MPCs [100, 103]. Okazuje się, że MPCs same przyciągają makrofagi do miejsca pouszkodzeniowej regeneracji i wykorzystują je poprzez cząsteczki adhezyjne, jako wsparcie dla ucieczki przed apoptozą związaną z procesem fuzji i tworzeniem miotub [19, 45]. Makrofagi wspomagają także miotuby w utrzymaniu integralności strukturalnej podczas procesu wydłużania i przyłączania kolejnych mioblastów [20, 93]. Ważną rolę regulacyjną w procesie regeneracji odgrywają także limfocyty T regulatorowe (Treg), które osiągając szczyt swojej aktywności cztery dni po uszkodzeniu, promują przejście makrofagów z fenotypu prozapalnego M1 do przeciwzapalnego/proregeneracyjnego M2 oraz stymulują MPCs i regenerację mięśni [80, 100]. Eozynofile są również ważnymi komórkami zapalnymi w procesie regeneracji, ponieważ promują różnicowanie MPCs [80, 100]. Mogłoby się zatem wydawać, że rekrutacja dużej liczby komórek zapalnych byłaby korzystna dla przebiegu całego procesu regeneracji, z drugiej jednak strony, mogłoby to generować uwalnianie cytotoksycznych poziomów reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) i proteaz, z konsekwencją bardziej poważnego uszkodzenia mięśni, zmniejszenia aktywności MPCs i ich zdolności do różnicowania [42, 100]. W związku z tymi zjawiskami właściwa równowaga między populacjami komórek, ich interakcje oraz synchronizacja fazy zapalnej i fazy naprawy są niezbędne dla prawidłowego przebiegu i korzystnego wyniku pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych.

Oprócz pożądanego zjawiska proliferacji komórek duży wpływ na szybkość i intensywność procesu regeneracji ma również zjawisko apoptozy. Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, jest ważnym procesem towarzyszącym wielu stanom fizjologicznym i patologicznym, i jednym z głównych mechanizmów zapewniających homeostazę w organizmie. Stan równowagi pomiędzy procesami namnażania i śmierci komórek pozwala na zabezpieczenie organizmu przed nieprawidłowościami wynikającymi m.in. z nadmiernej proliferacji lub obumierania komórek w tkankach czy narządach, które mogą prowadzić do zaburzenia przebiegu wielu ważnych procesów życiowych. Apoptoza odgrywa istotną rolę w mięśniach szkieletowych i nasila się w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych, ponadto reguluje również proces regeneracji włókien mięśniowych [67]. Właściwa równowaga między zjawiskami proliferacji i apoptozy, zarówno w obrębie populacji komórek zapalnych, jaki i MPCs, miotub i młodych włókien mięśniowych, ma kluczowe

znaczenie dla prawidłowego przebiegu regeneracji włókien poprzecznie prążkowanych [38, 57, 83].

W związku ze złożonością interakcji komórkowych i zjawisk zachodzących podczas fazy zapalnej i fazy naprawy regeneracji mięśni szkieletowych istnieje wiele czynników mogących mieć pozytywny lub negatywny wpływ na przebieg tego procesu. Regeneracja mięśni szkieletowych jest zjawiskiem często występującym u ludzi i zwierząt i może być efektem chorób, np. dystrofii mięśniowych, ekspozycji na działanie czynników miotoksycznych, ostrych i tępych urazów, niedokrwienia, ekspozycji na działanie wysokich i niskich temperatur, interwencji chirurgicznych i ortopedycznych, intensywnego treningu, kontuzji, czy silnych skurczów mięśniowych [39]. Około 35-55% sportowych urazów mięśni wiąże się z ich uszkodzeniem na poziomie włókien mięśniowych [46]. Są to zatem sytuacje dość powszechnie występujące, na działanie których organizm narażony jest każdego dnia. Gdy do regeneracji mięśni dochodzi w zdrowym, młodym organizmie, przy prawidłowym poziomie substancji antyoksydacyjnych, odżywczych i sprawnie działającym systemie immunologicznym oraz systemie aktywacji MPCs, odnowa włókien mięśniowych zachodzi w sposób niezakłócony, zwykle w ciągu 14 - 21 dni [100]. Niestety istnieje wiele czynników mogących upośledzać aktywność proliferacyjną MPCs, ich zdolność do migracji, różnicowania i fuzji oraz zdolność fagocytarną komórek zapalnych i tym samym mogących osłabiać zdolność regeneracyjną mięśni. Dobrze znanymi czynnikami upośledzającymi te procesy są: niedożywienie, niedobory substancji antyoksydacyjnych, stres oksydacyjny, miopatie o różnej etiologii, proces starzenia mięśni (sarkopenia) oraz leki. Wciąż jednak niejasne są mechanizmy ich działania, jak również punkty krytyczne procesu regeneracji mięśni, dlatego wiedza na ten temat musi być na bieżąco uzupełniana. Ponadto, cały czas pojawiają się doniesienia na temat nowych substancji, szczególnie tych stosowanych długoterminowo, w przypadku których zaobserwowano efekt uboczny pod postacią zaburzenia odnowy włókien mięśniowych. Dlatego nieustanne pogłębianie wiedzy oraz identyfikacja i typowanie nowych czynników o działaniu miotoksycznym jest bardzo ważne. Tak samo ważne jest poszukiwanie czynników i substancji, które wspomagałyby i przyspieszały proces naprawy integralności miocytów.

Aktywność fagocytarna makrofagów w miejscu uszkodzenia włókien mięśniowych jest związana z uwalnianiem rodników ponadtlennokowych i enzymów hydrolitycznych odpowiedzialnych za peroksydację fosfolipidów, a następnie uszkodzenie błon plazmatycznych miocytów i komórek śródbłonna naczyń. Prowadzi to do wytwarzania nowych wolnych rodników ponadtlennokowych, stresu oksydacyjnego, aktywacji czynników transkrypcyjnych i apoptozy [53]. Dlatego dla prawidłowego przebiegu regeneracji mięśni konieczne jest

zachowanie właściwej równowagi pomiędzy wytwarzaniem ROS a systemem obrony antyoksydacyjnej. Odpowiedni poziom substancji wychwytyjących ROS w środowisku regenerujących się włókien mięśniowych jest ważny szczególnie dla ochrony MPCs przed apoptozą. Witamina E (α - tokoferol) i koenzym Q10 (CoQ10) jako przeciwutleniacze i stabilizatory błon plazmatycznych mają korzystny wpływ na przebieg regeneracji włókien mięśniowych [11, 64]. Obie te substancje wzmacniają aktywność fagocytarną makrofagów, co przyczynia się do szybkiego usuwania resztek uszkodzonych miocytów, a ponadto pozytywnie wpływają na aktywność proliferacyjną MPCs, powstawanie miotub i dojrzewanie młodych włókien mięśniowych [64]. Powstaje tym samym pytanie, czy terapia α -tokoferolem i CoQ10 mogłaby mieć wpływ na zjawisko apoptozy podczas regeneracji mięśni szkieletowych i jakie komórki byłyby docelowymi takiego efektu działania.

Wykazano, że niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (ang. Low-Energy Laser Irradiation, LELI) również pozytywnie wpływa na proces regeneracji włókien mięśniowych, poprzez przyspieszenie fagocytozy martwiczego kruszywa komórkowego, a także aktywację i proliferację MPCs [72, 85]. LELI ma jednak mniej korzystny wpływ na różnicowanie mioblastów i dojrzewanie nowo powstałych włókien mięśniowych [9, 72, 75, 85]. Główny mechanizm działania LELI opiera się na stymulacji cyklu komórkowego poprzez ścieżkę kinazy białkowej regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, ERK), należącej do grupy kinaz aktywowanych mitogenem (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK) [85]. LELI odgrywa także rolę strukturalnego przeciwutleniacza, zapobiegającego uszkodzeniom struktur komórkowych przez ROS i stymulującego aktywność wielu enzymów antyoksydacyjnych [17, 85]. Dlatego LELI ma również korzystny wpływ na integralność błon plazmatycznych, funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego i syntezę ATP. Wykazano również, że promieniowanie laserowe redukuje naciek zapalny w procesie pouszkodzeniowej regeneracji i stymuluje tworzenie nowych naczyń krwionośnych [17, 72, 74, 85]. Shefer i wsp. [86] wykazali natomiast, że LELI może redukować apoptozę jąder włókien mięśniowych oraz komórek miogenicznych w chorobach mięśni szkieletowych. Powstała zatem hipoteza, że LELI może chronić przed apoptozą komórki biorące udział w fazie zapalnej i fazie naprawy regeneracji mięśni szkieletowych. Poznanie tego aspektu działania promieniowania laserowego ma bardzo duże znaczenie poznawcze, szczególnie że laseroterapia jest powszechnie stosowana w leczeniu urazów tkanek miękkich i kości, czy trudno gojących się ran.

Jedną z grup leków które mogą obniżać zdolność mięśni szkieletowych do regeneracji są statyny. Należą one do inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A

(HMG-CoA), a stosowane są powszechnie do obniżania poziomu cholesterolu w leczeniu hiperlipidemii i chorobie miażdżycowej naczyń. Statyny wykazują również niezależne od cholesterolu (plejotropowe) działania, takie jak poprawa funkcji śródbłonna naczyniowego, zmniejszenie wytwarzania ROS i osłabienie rekrutacji komórek zapalnych [61, 88]. Wykazano, że statyny a wśród nich simwastatyna (SIM), obniżają stężenie czynników prozapalnych i cytokin, obniżają ekspresję cząsteczek adhezyjnych i cząsteczek sygnałowych, i tym samym wpływają na zmniejszenie nacieku neutrofilii i makrofagów w miejscu traumatyzacji tkanek [21, 102]. SIM zwiększa także apoptozę neutrofilii, z następowym mniejszym uszkodzeniem tkanek po zabiegach pomostowania krążeniowo-płucnego [21]. Ostatnie badania wykazały jednak, że statyny wykazują miotoksyczny efekt uboczny wynikający z wywoływania nadpobudliwości błon komórkowych, upośledzenia funkcji mitochondriów i homeostazy Ca^{2+} , obniżenia ubichinonu oraz indukcji apoptozy w mięśniach szkieletowych [13, 54, 88]. Co więcej, SIM jako substancja lipofilna ma większą zdolność do penetracji komórek mięśniowych i zmiany ich struktur błonowych, w związku z tym jej suplementacja wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia miopatii w porównaniu z innymi statynami [43, 67, 88]. Ponadto niektóre badania sugerują, że SIM może upośledzać proliferację i różnicowanie MPCs oraz ograniczać ich fuzję [43, 49, 88, 101]. Biorąc pod uwagę wszystkie właściwości SIM postawiono tezę, że może ona modulować przebieg zarówno fazy zapalnej, jak i fazy naprawy procesu regeneracji włókien mięśniowych. Poznanie tego, niezbadanego jeszcze aspektu działania SIM jest bardzo ważne z uwagi na powszechne, długoterminowe stosowanie statyn szczególnie przez osoby starsze, u których terapia może być czynnikiem zwiększającym ryzyko związanej z wiekiem utraty funkcjonowania i zdolności regeneracyjnych mięśni szkieletowych [24, 29].

Innym lekiem który ze względu na swoje właściwości może mieć niekorzystny wpływ na przebieg procesu regeneracji mięśni jest deksametazon (DEX). DEX to glikokortykosteroid (GC) o działaniu immunosupresyjnym, przeciwzapalnym i przeciwalergicznym [50]. Przeciwzapalne właściwości DEX polegają na hamowaniu produkcji prozapalnych cytokin, chemokin i czynników wzrostu oraz zwiększeniu wytwarzania tlenku azotu (NO) w komórkach śródbłonna naczyń, co powoduje zmniejszenie rekrutacji i migracji neutrofilii oraz makrofagów do ognisk zapalnych [69, 78]. DEX ogranicza również odpowiedź immunologiczną, poprzez indukcję apoptozy eozynofili i leukocytów [18, 79]. Glikokortykosteroidy, ze względu na właściwości przeciwzapalne, są dobrze znanymi czynnikami regulującymi wiele aspektów fizjologii śródbłonna naczyń, w tym poziomów ekspresji cząsteczek adhezyjnych, wytwarzania prozapalnych cytokin i chemokin oraz zachowania integralności bariery śródbłonkowej [78,

112]. Jednakże Iuchi i wsp. [35] wykazali, że GCs mogą wywoływać dysfunkcje śródbłonna naczyń poprzez indukowanie nadprodukcji ROS przez komórki śródbłonna. Dlatego też, z powodu alarmujących wyników badań dotyczących efektów ubocznych działania GCs, podjęto szczegółowe badania nad potencjalnie negatywnymi skutkami długo- i krótkoterminowej terapii DEX na układ sercowo-naczyniowy, gojenie ran i stan mięśni szkieletowych [36, 84]. Badania nad procesem gojenia ran u ludzi i zwierząt potwierdziły negatywny wpływ DEX na jego przebieg, który prawdopodobnie pojawia się już na wczesnym etapie i polega na zmniejszeniu liczby makrofagów i neutrofilów z następowym opóźnieniem usuwania kruszywa komórkowego oraz obniżeniu sekrecji interleukin, cytokin, chemokin i czynników wzrostu w miejscu urazu [25, 84, 92]. W odniesieniu do mięśni szkieletowych zaobserwowano, że DEX zwiększa katabolizm białek u młodych szczurów, natomiast u osobników starszych zmniejsza syntezę białek oraz morfologicznie i funkcjonalnie uszkadza MPCs [36, 81]. Ponadto wykazano, że GCs mogą indukować apoptozę w mięśniach szkieletowych poprzez aktywację szlaków zależnych od mitochondriów i receptora FAS [67]. Terapia GCs może powodować także dysfunkcję mitochondriów w komórkach mięśniowych poprzez upośledzenie metabolizmu oksydacyjnego i nadprodukcję ROS, z późniejszymi uszkodzeniami mitochondriów [63]. DEX obniża również aktywność proliferacyjną i zdolność do regeneracji mioblastów, oraz nasila ich apoptozę [87]. Niektóre badania *in vitro* wykazały jednak korzystny, zależny od dawki wpływ DEX na miogenezę u myszy poprzez zwiększenie aktywności proliferacyjnej, różnicowania i fuzji MPCs [6, 96]. Aby lepiej zrozumieć mechanizmy leżące u podstawy potencjalnego efektu przeciwregeneracyjnego DEX, zdecydowałam się na przeprowadzenie badań w tym zakresie. Główna hipoteza badawcza zakładała, że leczenie DEX wpływa na obie fazy regeneracji, przede wszystkim jednak na fazę naprawy poprzez osłabienie rekrutacji, aktywności i różnicowania MPCs. Wyjaśnienie i poznanie tych mechanizmów działania DEX jest bardzo ważne, ze względu na częste stosowanie tego leku w leczeniu schorzeń u ludzi i zwierząt, szczególnie w terapii chorób przewlekłych wymagających długotrwałego stosowania przeciwzapalnych dawek podtrzymujących.

W podjętych badaniach nad przebiegiem procesu regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych w warunkach ekspozycji na działanie czynników o właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, proapoptotycznych i miotoksycznych wykorzystano dobrze znany model chemicznego uszkodzenia mięśni za pomocą pojedynczej iniekcji 0,5% roztworu chlorowodoru bupiwakainy (ang. Bupivacaine Hydrochloride, BPVC). Bupiwakaina jest anestetykiem wykorzystywanym głównie do znieczulania miejscowego, wywołującym w

miejscu aplikacji homogenny rozpad włókien mięśniowych z następującą ich regeneracją w ciągu 14 dni. Z uwagi na powtarzalność i szybkość zjawisk zachodzących w obu fazach regeneracji oraz zachowanie integralności błony podstawnej włókien mięśniowych, która jest ważna dla proliferacji i migracji komórek satelitarnych, oraz brak uszkodzenia MPCs, ten model uszkodzenia mięśni zaczął być wykorzystywany w badaniach nad przyczynami niepowodzenia procesu odnowy włókien mięśni poprzecznie prążkowanych w różnych warunkach, takich jak dystrofia mięśniowa, czy autoimmunologiczne zapalenie mięśni [1, 41, 48, 60]. Ponadto model ten ma zastosowanie w badaniach nad pozytywnym lub negatywnym wpływem różnych substancji oraz czynników fizycznych na przebieg regeneracji mięśni i miogenezę [3, 66, 77]. Regeneracja mięśni wywołana przez BPVC wydaje się być również dobrym modelem eksperymentalnym w badaniach nad zjawiskiem sarkopenii i związanego z wiekiem spadku zdolności regeneracyjnej mięśni szkieletowych.

W związku z powyższym oraz w toku wieloletnich badań własnych nad procesem regeneracji mięśni poprzecznie prążkowanych opracowano specjalny model eksperymentalny obustronnego uszkodzenia mięśnia najdłuższego lędźwi *longissimus lumborum* za pomocą pojedynczej iniekcji 10 ml 0,5% roztworu BPVC [64, 66, 72]. Ponadto na podstawie wiedzy dotyczącej kaskady zjawisk zachodzących podczas procesu regeneracji wyznaczono odpowiednie dni pobierania materiału badawczego, tj. dzień 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 po uszkodzeniu, celem uzyskania najbardziej reprezentatywnych próbek dla fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Ten schemat badawczy został zastosowany we wszystkich eksperymentach, których wyniki opublikowano w artykułach stanowiących cykl osiągnięcia naukowego.

W toku wieloletnich badań i obserwacji zjawisk składających się na proces odnowy włókien mięśniowych zaistniała potrzeba udoskonalenia i ujednoczenia sposobu prowadzenia morfometrycznych analiz mikroskopowych. W związku z tym zaprojektowano oryginalny system punktowej oceny zjawisk towarzyszących: (a) fazie zapalenia, tj. wynaczynienia, martwicy i nacieku zapalnego oraz (b) fazie naprawy regeneracji, tj. obecności MPCs, miotub i młodych włókien mięśniowych. System punktacji po raz pierwszy został użyty w badaniach nad wpływem SIM na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych i został szczegółowo opisany w artykule 4.1.2. stanowiącym część osiągnięcia naukowego.

W podjętych badaniach wykorzystano model świni, który został wybrany ze względu na podobieństwo genetyczne, anatomiczne i strukturalne z mięśniami człowieka [94, 107] oraz w oparciu o doświadczenie własne w przeprowadzaniu badań z użyciem tego modelu zwierzęcego [64, 66, 72]. Ponadto świnię, a szczególnie prosięta, mają dobrą i szybką zdolność

do regeneracji tkanek [91]. Rozmiar, bliskość i dostępność lewego i prawego mięśnia najdłuższego lędźwi *longissimus lumborum* u świń również były bardzo ważnym kryterium. Użycie tego modelu zwierzęcego dało również możliwość szybkiego przeprowadzenia procedur eksperymentalnych i uzyskania próbek mięśni o rozmiarach wystarczających do przeprowadzenia wszystkich analiz histologicznych, immunohistochemicznych i ilościowych oraz, co najważniejsze pozwoliło zredukować liczbę zwierząt wykorzystywanych w eksperymentach. Znaczenie tego kryterium w badaniach biomedycznych jest bardzo podkreślane przez wielu badaczy [89, 90]. Ponadto, stosując model badawczy świni, określenie właściwej dawki leków stosowanych w eksperymentach w odniesieniu do dawek stosowanych u ludzi jest łatwiejsze i bardziej odpowiednie. Z powyższych powodów świnia, zaczęła być uważana za bardzo dobry model do badań nad zaburzeniami m.in. mięśni szkieletowych u człowieka [82].

Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione aspekty działania scharakteryzowanych wcześniej czynników o działaniu miotoksycznym i mioprotekcyjnym, zdecydowano się na przeprowadzenie badań, które pozwoliłyby poszerzyć wiedzę na temat mechanizmów leżących u podstawy ich wpływu na zjawiska towarzyszące fazie zapalenia i fazie naprawy pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Postawiono zatem następujące cele badawcze:

1. Określenie wpływu LELI, CoQ10 i witaminy E na apoptozę komórek w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.
2. Porównanie mioprotekcyjnego działania LELI z działaniem witaminy E i CoQ10 na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.
3. Określenie wpływu SIM na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.
4. Określenie wpływu DEX na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.

4.2.2. Wpływ LELI, koenzymu Q10 i witaminy E na apoptozę komórek w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych u prosiąt

4.2.2.1 Wprowadzenie

Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań pokazały, że LELI pozytywnie wpływa na proces pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych poprzez pobudzenie aktywności

fagocytarnej makrofagów, proliferacji MPCs, a w mniejszym zaś stopniu na różnicowanie mioblastów i dojrzewanie nowo powstałych włókien mięśniowych [72]. Wykazano również, że promieniowanie laserowe redukuje naciek zapalny w miejscu uszkodzenia miocytów [72]. Wyniki innych badań wykazały, że LELI może redukować apoptozę jąder włókien mięśniowych i komórek miogenicznych [86]. Uzyskane wcześniej wyniki badań w zakresie wpływu witaminy E i CoQ10 na przebieg regeneracji włókien mięśniowych pokazały, że obie substancje wzmacniają aktywność fagocytarną makrofagów oraz aktywność proliferacyjną MPCs, powstawanie miotub i dojrzewanie młodych włókien mięśniowych i tym samym pozytywnie regulują ten proces [64]. W dostępnej literaturze brak jest jednak danych na temat wpływu witaminy E i CoQ10 na zjawisko apoptozy wśród populacji komórek odgrywających kluczową rolę w procesie regeneracji miocytów. Biorąc powyższe pod uwagę wysunięto hipotezę, że mioprotekcyjne działanie LELI, witaminy E i CoQ10 może być również związane z hamowaniem apoptozy komórek w przebiegu naprawy włókien mięśniowych. Celem weryfikacji postawionej hipotezy zbadano wpływ LELI, witaminy E i CoQ10 na apoptozę makrofagów i MPCs podczas pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Celem podjętych badań było również porównanie potencjału mioprotekcyjnego działania LELI z działaniem witaminy E i CoQ10 na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.

4.2.2.2 Materiały i metody

Eksperyment przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych, uzyskując zgodę na jego wykonanie od Lokalnej Komisji Etycznej na podstawie Uchwały nr 24/2006/N. Badania przeprowadzono na 75 loszkach rasy wielkiej białej polskiej w wieku 10 tygodni i średniej masie ciała 20 kg. Zwierzęta podzielono losowo na 5 grup: grupa I kontrolna (15 loszek), grupa II (15 loszek) poddana laseroterapii, grupa III (15 loszek) otrzymująca CoQ10, grupa IV (15 loszek) otrzymująca łącznie CoQ10 i witaminę E, oraz grupa V (15 loszek) otrzymująca witaminę E. U zwierząt wszystkich grup, w tym samym dniu, po zastosowaniu wcześniejszej premedykacji (domięśniowa iniekcja 2 mg/kg azaperonu; Stresnil, Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgium, oraz 0,05 mg/kg atropiny; Atropinum Sulfuricum, Polfa S.A, Warsaw, Polska) dokonano obustronnego (po obu stronach kręgosłupa) uszkodzenia mięśnia najdłuższego lędźwi za pomocą pojedynczej iniekcji 10 ml 0,5% BPVC. Zwierzęta z każdej grupy w kolejnych dniach po uszkodzeniu, tj. w dniu 1 (po jednej loszce z każdej grupy), 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 (po 2 loszki z każdej grupy) poddano eutanazji przez dożylną iniekcję soli sodowej pentobarbitalu (Morbital, Biowet, Puławy, Polska) po wcześniejszej

premedykacji (domięśniowa iniekcja 2 mg/kg azaperonu; Stresnil, Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgia). Podczas eksperymentu zwierzęta z grupy II poddano punktowej (w miejscu uszkodzenia mięśni) terapii niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (CTL-1106 MX, Laser Instruments Ltd., Polska) o długości fali 830 nm i następujących parametrach: moc 100 mW, powierzchnia ekspozycji 4,9 cm², energia 4J / cm², czas ekspozycji 3,16 s. Pierwszą aplikację wykonano 18 godzin po wywołanym uszkodzeniu mięśni, następnymi czterech aplikacjach dokonano w kolejnych dwudziestoczterogodzinnych odstępach czasowych. Zwierzętom grupy III przez 5 kolejnych dni po uszkodzeniu mięśni podawano doustnie CoQ10 (Jemo-Pharm A/S, Dania) w dawce 120 mg/zwierzę/dobę. Pierwszą dawkę koenzymu podano 8 godzin po iniekcji BPVC. Zwierzętom grupy IV przez 5 kolejnych dni po uszkodzeniu mięśni podawano CoQ10 (zastosowano taki sam protokół terapii jak w grupie III) oraz w formie domięśniowej witaminę E (Tocopherolum aceticum, Polfa, Polska) w dawce 150 mg/zwierzę/dobę. Pierwszą dawkę witaminy E podano 18 godzin po iniekcji BPVC. Zwierzęta grupy V przez 5 kolejnych dni po uszkodzeniu mięśni traktowano witaminą E (zastosowano taki sam protokół terapii jak w grupie IV). Sposób laseroterapii oraz dawki CoQ10 i witaminy E dobrano w oparciu o efekty ich działania w odniesieniu do procesu regeneracji mięśni szkieletowych obserwowane w wcześniejszych eksperymentach [64, 72].

Bezpośrednio po eutanazji od wszystkich zwierząt z każdej grupy pobierano wycinki uszkodzonych mięśni, utrwalono je w zbuforowanej 10% formalinie, zatopiono w parafinie i pocięto na 3µm skrawki. Skrawki przekrojów podłużnych i poprzecznych mięśni barwiono hematoksyliną Mayera i eozyną w celu oceny histopatologicznej postępu regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych. Apoptozę w skrawkach tkanek wykrywano metodą TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) przy użyciu komercyjnego zestawu do barwienia (2TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit, Trevigen, USA). Odparafinowane i odwodnione skrawki inkubowano w roztworze proteiny K przez 1h w temperaturze 37°C. Po inaktywacji endogennej peroksydazy w 3% roztworze nadtlenu wodoru w metanolu (5 min. w temperaturze pokojowej), skrawki inkubowano w buforze terminalnej nukleotydylotransferazy (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Skrawki dalej inkubowano w temperaturze 37°C przez godzinę w mieszaninie reakcyjnej zawierającej bufor znakujący TdT, enzym TdT, biotynylowane nukleotydy i Co²⁺, następnie reakcję zatrzymywano w buforze TdT (5 min. w temperaturze pokojowej). W kontroli ujemnej pominięto enzym TdT w mieszaninie reakcyjnej, a nukleazę TACS dodano do znakującej mieszaniny reakcyjnej w kontroli dodatniej. Następnie skrawki inkubowano z koniugatem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa przez 10 min. w

temperaturze 37°C i wybarwiono roztworem diaminobenzydyny (DAB) przez 7 min. w temperaturze pokojowej, a następnie podbarwiano hematoksyliną Mayera. Brązowe precipitaty w jądrach komórkowych uznano za reakcję dodatnią. Apoptozę oceniano w makrofagach oraz MPCs i liczono w każdym skrawku przy powiększeniu 40x w 10 polach obszaru uszkodzenia mięśni. Indeks apoptotyczny wyrażono jako procent komórek reagujących dodatnio w obszarze martwicy.

W każdej grupie, w każdym badanym dniu obliczono średni indeks apoptotyczny (wraz z odchyleniem standardowym). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA F. Różnice między ocenianymi grupami, a także między dniami po wywołanym uszkodzeniu mięśni w każdej grupie oszacowano za pomocą testu SNK (Student-Newman-Keuls). Różnice uznawano za istotne, gdy $p < 0,05$.

4.2.2.3 Wyniki i dyskusja

Badania potwierdziły wcześniej uzyskane wyniki [64, 72] i wykazały korzystny wpływ LELI, CoQ10 i witaminy E na proces pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych. Okazało się jednak, że proces uprzątnia martwiczych włókien mięśniowych pod wpływem LELI, jak i jednoczesnego stosowania CoQ10 i witaminy E nastąpił szybciej w porównaniu z pozostałymi grupami badawczymi. Obserwacje te potwierdziły wyniki innych badań ukazujących korzystny wpływ LELI oraz CoQ10 i witaminy E na aktywność fagocytarną makrofagów i tym samym szybkość uprzątnia martwiczego kruszywa komórkowego [10, 11, 62, 64, 72, 99, 106]. Wyniki naszych badań pokazały jednak, że siła działania obu substancji, tj. CoQ10 i witaminy E, dopiero przy łącznym stosowaniu jest porównywalna z efektem działania laseroterapii, co jest oryginalnym wynikiem przeprowadzonych badań. Wyniki badań potwierdziły również korzystny wpływ LELI, CoQ10 i witaminy E na obecność i aktywność MPCs, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w innych badaniach, w których potwierdzono wzrost aktywności proliferacyjnej MPCs pod wpływem LELI [17, 72, 85, 111] i CoQ10 [65]. Wpływ witaminy E na proliferację MPCs jest kontrowersyjny. W niniejszym badaniu nie wykazano różnic w udziale MPCs w regeneracji uszkodzonych włókien podczas stosowania witaminy E w porównaniu z pozostałymi grupami eksperymentalnymi, chociaż wyniki naszych wcześniejszych badań pokazały, że stosowanie samej witaminy E nie wpływa w sposób znaczący na ten proces [64]. Okazało się natomiast, że witamina E podawana osobno lub wspólnie z CoQ10, oraz sam CoQ10 działają korzystniej na proces tworzenia miotub i młodych włókien mięśniowych w porównaniu z laseroterapią. Wynik ten jest dość zaskakującym i oryginalnym efektem przeprowadzonych badań, chociaż zgodnym z innymi doniesieniami

sugerującymi niekorzystny wpływ LELI na proces tworzenia miotub i młodych włókien poprzez hamowanie dojrzewania oraz fuzji MPCs [9, 72, 85].

Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę, że LELI, CoQ10 i witamina E hamują apoptozę komórek w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych. Wyniki badań wykazały, że laseroterapia ma największe działanie antyapoptotyczne w obszarze regeneracji mięśni, a docelowymi komórkami efektu jego działania są głównie makrofagi, w mniejszym zaś stopniu MPCs. Takie ochronne działanie LELI na komórki miogeniczne, będące efektem zwiększenia aktywności białek antyapoptotycznych i redukcji ekspresji białek proapoptotycznych zostało potwierdzone również przez innych badaczy [86]. Z drugiej jednak strony, mając na uwadze wzajemne korelacje komórek miogenicznych i makrofagów, ochrona MPCs przed apoptozą może być wynikiem antyapoptotycznego, ochronnego działania LELI na makrofagi [20, 93]. Indeksy apoptotyczne były również niskie w grupie traktowanej witaminą E, ale jej działanie ochronne było ograniczone głównie do makrofagów. Działanie antyapoptotyczne witaminy E potwierdzono w badaniach, przede wszystkim *in vitro*, na różnych populacjach komórkowych [30, 31, 73]. W dostępnej literaturze brak jest jednak doniesień na temat wpływu witaminy E na zjawisko apoptozy w przebiegu regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych, dlatego wyniki naszych badań są unikatowe. Co ciekawe, nasze badania pokazały, że ochrona makrofagów przed apoptozą nie przekładała się na szybkość usuwania martwiczych resztek w grupie traktowanej witaminą E. Może to oznaczać, że komórkami docelowym efektu jej działania mogły być nie makrofagi M1, a makrofagi M2, co dalej miało wpływ na stymulację proliferacji MPCs, oraz ochronę MPCs przed apoptozą, szczególnie związaną z fuzją mioblastów i procesem tworzenia miotub i młodych włókien [20, 93]. CoQ10, nawet przy stosowaniu łącznym z witaminą E, wykazał mniejszy efekt antyapoptotyczny w porównaniu z innymi czynnikami stosowanymi w eksperymencie. Działanie ochronne CoQ10 przed apoptozą zostało potwierdzone przez innych badaczy, jednak wydaje się że głównie polega ono na hamowaniu aktywności i ekspresji kaspazy 2 i 3, istotnych podczas wczesnych faz apoptozy, a nie wpływa zaś na późny etap apoptozy związany z fragmentacją DNA [22, 28, 37]. W naszym eksperymencie wykrywaliśmy późny etap apoptozy metodą TUNEL w związku z tym nie mogliśmy wykazać pełnego antyapoptotycznego działania CoQ10. Trudno jest natomiast wytłumaczyć słabe działanie antyapoptotyczne CoQ10 i witaminy E przy jednoczesnym stosowaniu. Wyjaśnienie tego fenomenu wymaga dalszych badań.

Reasumując, przeprowadzone badania potwierdziły korzystne działanie wszystkich badanych czynników na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych, a w

szczegółności na aktywność fagocytarną makrofagów oraz aktywację i proliferację MPCs. Oryginalnym wynikiem badań było wykazanie, że witamina E podawana osobno lub wspólnie z CoQ10, oraz sam CoQ10 mają korzystniejszy wpływ na proces tworzenia miotub i młodych włókien mięśniowych, natomiast LELI oraz jednocześnie stosowanie CoQ10 i witaminy E skuteczniej działa na aktywność fagocytarną makrofagów. Nasze badania ujawniły również antyapoptotyczne działanie LELI i witaminy E na makrofagi oraz LELI na MPCs. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat wpływu czynników o działaniu antyoksydacyjnym i mioprotekcyjnym na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych, a w szczególności na zjawisko apoptozy w kontekście wrażliwości poszczególnych populacji komórek. Mają zatem duże znaczenie poznawcze i rzucają nowe światło na zjawiska zachodzące podczas regeneracji mięśni, co może dalej być pomocne w badaniach nad możliwością modulacji odnowy włókien mięśniowych.

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

Otrocka-Domagala I., Mikołajczyk A., Paździor-Czapula K., Gesek M. (2015) Rotkiewicz T., Mikiewicz M. *Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post injury regeneration in pigs.* Pol. J. Vet. Sci. 18: 523-531.

4.2.3. Wpływ simwastatyny na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych

4.2.3.1. Wprowadzenie

Wyniki najnowszych badań klinicznych sugerują, że przewlekłe stosowanie lipofilnych statyn może osłabić zdolność mięśni szkieletowych do regeneracji, a szczególnym ryzykiem obarczeni są pacjenci w podeszłym wieku z uwagi na związaną z wiekiem sarkopenią [24, 29]. Ponieważ ta aktywność statyn jest słabo poznana, celem badań było zbadanie wpływu SIM na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Główna hipoteza badawcza zakładała, że SIM wpływa nie tylko na fazę naprawy, ale także na fazę zapalną procesu regeneracji. Ponadto postawiono hipotezę, że następujące właściwości SIM leżą u podstaw tego działania: (a) poprawa funkcjonowania śródbłonna naczyń, (b) działanie przeciwzapalne, (c) modulacja proliferacji i różnicowania MPCs oraz (d) miotoksyczność. W celu weryfikacji tych hipotez podjęto niniejsze badania.

4.2.3.2. Materiały i metody

Eksperyment przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych, uzyskując zgodę na jego wykonanie od Lokalnej Komisji Etycznej na podstawie Uchwały nr 62/2010. Badania przeprowadzono na 48 loszkach rasy wielkiej białej polskiej w wieku około 3 miesięcy. Zwierzęta podzielono losowo na 2 grupy: grupa kontrolna (24 loszki), tj. zwierzęta nieotrzymujące SIM oraz grupa eksperymentalna (24 loszki), tj. zwierzęta otrzymujące doustnie SIM (Simvasterol, Polpharma, Polska) od pierwszego do ostatniego dnia doświadczenia w codziennej dawce 40 mg/zwierzę (około 1 mg/kg). Dawkę SIM wybrano na podstawie opublikowanych doniesień wskazujących na jej niskie ryzyko wystąpienia objawów miotoksycznych [16, 70]. W 15 dniu eksperymentu (dzień 0) u wszystkich zwierząt obu grup, w tym samym dniu, dokonano obustronnego (po obu stronach kręgosłupa) uszkodzenia mięśnia najdłuższego łądźwi za pomocą pojedynczej iniekcji 10 ml 0,5% BPVC, według procedury opisanej w punkcie 4.2.2.2. Następnie po 3 zwierzęta z każdej grupy w kolejnych dniach po uszkodzeniu tj. w dniu 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 poddano eutanazji, według procedury opisanej w punkcie 4.2.2.2.

Bezpośrednio po eutanazji pobrano próbki z miejsc uszkodzenia prawego i lewego mięśnia najdłuższego łądźwi (dwa przekroje podłużne i dwa przekroje poprzeczne z każdego miejsca) od każdego zwierzęcia z obu grup w dniu 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 po iniekcji BPVC. Wszystkie podłużne i poprzeczne skrawki mięśni przygotowano techniką parafinową i barwiono hematoksyliną Mayera i eozyną w celu oceny histopatologicznej postępu regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych. Obecność MPCs potwierdzono ekspresją MyoD1 i desminy, a obecność miotub i młodych włókien mięśniowych ekspresją desminy. Do barwień immunohistochemicznych użyto przeciwciała anti-MyoD1 (clon 5.8A, Dako, Glostrup, Dania) w rozcieńczeniu 1:50 oraz przeciwciała anti-desmin (clon D33, Dako, Glostrup, Dania) w rozcieńczeniu 1:50. Oznaczenia immunohistochemiczne przeprowadzono metodą immunoperoxydazową przy użyciu komercyjnego systemu do wizualizacji (EnVision+System-HRP, mouse, DAB, Dako, Glostrup, Dania) stosując 3,3'-diaminobenzodynę jako chromogen. Skrawki następnie podbarwiano hematoksyliną Mayera. Pozytywne i negatywne kontrole były wykonywane równolegle z ocenianymi preparatami przy zastosowaniu tych samych protokołów.

Regeneracja włókien mięśniowych została oceniana na podstawie obserwacji zjawisk towarzyszących fazie zapalenia tj. wynaczynienia, martwicy i nacieku zapalnego oraz fazie naprawy regeneracji, tj. obecności MPCs, miotub i młodych włókien mięśniowych. Cechy te

oceniano przy powiększeniu 40x w 10 obszarach uszkodzenia mięśni w każdym przekroju (dwa przekroje wzdłużne i dwie poprzeczne). Obecność MPCs, miotub i młodych włókien mięśniowych została potwierdzona na podstawie badań immunohistochemicznych, a ich ilość oceniono jako liczbę komórek dodatnich przy powiększeniu 40x w 10 obszarach uszkodzenia mięśni w każdym przekroju (dwa przekroje wzdłużne i dwie poprzeczne). Do oceny stopnia nasilenia zjawisk fazy zapalnej i naprawy użyto specjalnie opracowanego, a więc oryginalnego systemu punktowej oceny, który szczegółowo opisano w artykule 4.1.2. stanowiącym część osiągnięcia naukowego.

Uzyskane dane wyrażono jako średnią (\pm SD) punktów uzyskanych na podstawie systemu punktacji przypadających na uszkodzoną powierzchnię mięśnia. Dane reprezentowały wyniki uzyskane z sześciu miejsc uszkodzonego mięśnia na grupę, na punkt czasowy [trzy zwierzęta i dwa niezależne urazy mięśni/zwierzę/punkt czasowy]. W celu porównania wyników między grupą leczoną SIM, a grupą kontrolną zastosowano test t-Studenta. Analizę statystyczną kinetyki (tj. wielokrotnych porównań między poszczególnymi punktami czasowymi w grupie) cech fazy zapalenia i naprawy w obu grupach przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu *post hoc* Bonferroniego. Różnice uznawano za istotne, gdy $p < 0,05$. Do analizy statystycznej i przygotowania wykresów użyto oprogramowania SigmaPlot w wersji 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornia, USA).

4.2.3.3. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki dostarczają dowodów na poparcie głównej hipotezy, że SIM wpływa zarówno na fazę zapalenia, jak i fazę naprawy procesu pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych. Jednak wpływ SIM na obie fazy regeneracji był niekorzystny. W fazie zapalenia statyna spowodowała zwiększenie rozległości wynaczynienia i przedłużenie jego obecności, wydłużyła czas trwania martwicy oraz przedłużyła i zwiększyła naciek komórek zapalnych. W fazie naprawy SIM spowodowała opóźnienie i przedłużenie aktywności MPCs, opóźnienie procesu tworzenia miotub oraz opóźnienie i osłabienie procesu tworzenia młodych włókien.

Uzyskane wyniki badań nie są zgodne z danymi przedstawionymi przez innych badaczy, które potwierdzają korzystny wpływ statyn na czynność śródbłonna naczyniowego [27, 51, 61]. Jednakże zaobserwowane rozległe i długotrwałe krwawienie w miejscu iniekcji BPVC mogło wynikać z innych właściwości SIM, a przede wszystkim hamowania adhezji i agregacji płytek w miejscu uszkodzenia naczyń. Takie działanie przeciwplatek i przeciwzakrzepowe statyn zostało również potwierdzone w innych badaniach [55, 61, 71, 104]. Wyniki naszych badań wykazały, że SIM w dawce dobowej 40 mg (około 1 mg / kg) nie nasiliła

istotnie martwicy włókien mięśniowych w ciągu pierwszych dwóch dni po urazie mięśni, tj. w 16 i 17 dniu stosowania, co oznacza, że nie wykazała ona efektu miotoksycznego na tym etapie regeneracji. Badania przeprowadzone u ludzi również potwierdziły niskie ryzyko wystąpienia miopatii i rhabdomyolizy podczas terapii SIM w dawce dobowej 40 mg, chociaż takie ryzyko wzrasta wraz z długością terapii i zwiększeniem dawki [34]. Zaskakująco jednak wyniki naszych badań wykazały, że od 3 dnia po uszkodzeniu nastąpiło znaczne nasilenie martwicy pod wpływem SIM, a zjawisku temu towarzyszyło nasilone naciekanie komórek zapalnych. Wysłunięto zatem wniosek, że SIM nie wykazała efektu przeciwzapalnego, co pozostało w sprzeczności z wynikami innych badań potwierdzających zdolność statyn do zmniejszania rekrutacji neutrofile i makrofagów [21, 23, 102]. Ponadto, utrzymujący się wysoki poziom stanu zapalnego podczas stosowania SIM powinien przyspieszyć usuwanie resztek komórkowych i tym samym zmniejszyć czas trwania martwicy i pozytywnie wpłynąć na regenerację, tego efektu jednak nie uzyskano w niniejszym badaniu. Przyczyna tego zjawiska może być związana z masowym uwalnianiem proteaz i cytotoksycznych poziomów ROS przez liczne neutrofile i makrofagi M1, co przyczyniło się do pogłębienia uszkodzenia mięśni [42, 100]. Ponadto indukowana przez SIM redukcja aktywności fagocytarnej komórek zapalnych również może być wytłumaczeniem tego zjawiska, a takie właściwości statyny zostały potwierdzone przez innych badaczy [5, 8, 102]. Co więcej, nieprawidłowa aktywność fagocytarna komórek zapalnych może być również wynikiem zwiększonej apoptozy neutrofile i makrofagów pod wpływem SIM, co sugerują inni badacze [21, 23]. Ponadto, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań, oraz fakt, że aktywność makrofagów M1 i M2 rozpoczyna się w dniu 3 regeneracji, należy założyć, że SIM wpływa na te komórki zapalne, a nie na neutrofile. Mechanizm leżący u podstaw tego działania i jego wpływ na regenerację miocytów pozostaje niewyjaśniony. Ponadto uzyskane wyniki pozwalają postawić hipotezę, że SIM negatywnie wpływa raczej na populację makrofagów fagocytujących M1, a nie na makrofagi M2, ponieważ zwiększona liczba komórek zapalnych obserwowana podczas stosowania SIM była skorelowana ze zwiększoną liczbą MPCs. Uzyskane wyniki wskazują, że SIM istotnie upośledziła fazę naprawy regeneracji włókien mięśniowych, co objawiało się znacznym opóźnieniem aktywacji MPCs, opóźnieniem procesu tworzenia miotub oraz opóźnieniem i osłabieniem procesu tworzenia młodych włókien mięśniowych w porównaniu z grupą kontrolną. To odkrycie jest zgodne z wcześniejszymi badaniami, które potwierdzają zdolność statyn do zmniejszania aktywności, wzrostu, różnicowania i fuzji MPCs i tym samym do obniżania zdolności regeneracyjnych mięśni szkieletowych [49, 88, 101]. Ponadto, stwierdzone w badaniu istotne zmniejszenie liczby MPCs w ciągu pierwszych trzech dni po uszkodzeniu u zwierząt

otrzymujących SIM mogło być efektem hamowania przez statynę migracji komórek mioogenicznych do miejsca uszkodzenia [100, 103]. Opóźnione formowanie miotub i zmniejszenie liczby młodych włókien obserwowane u zwierząt traktowanych SIM mogło natomiast być spowodowane zdolnością statyn do hamowania syntezy białek i ATP oraz niszczenia nowo utworzonych miotub, na co wskazują wyniki innych badań [52, 109]. Obserwowany w badaniu własnym negatywny wpływ SIM na fazę naprawy mógl również być wynikiem upośledzenia homeostazy Ca^{2+} w MPCs, miotubach i młodych włóknach oraz aktywacji apoptozy za pośrednictwem szlaku mitochondrialnego [13, 61, 109]. Niestety, mechanizm leżący u podstaw przedłużającej się obecności MPCs w miejscu uszkodzenia u zwierząt otrzymujących SIM pozostaje na tym etapie badań niewyjaśniony. Być może był on efektem przedłużonego i nasilonego nacieku komórek zapalnych i martwicy, co doprowadziło do trwałej stymulacji MPCs.

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują, że SIM upośledza proces pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych. Działanie to jest wieloczynnikowe i dotyczy zarówno fazy zapalenia, jak i fazy naprawy, co ostatecznie powoduje wyraźne opóźnienie procesu regeneracji. W fazie zapalenia statyna zwiększyła ryzyko wystąpienia przedłużonego krwawienia i nie wykazała działania przeciwzapalnego. Co więcej, okazało się, że SIM zmniejszyła aktywność makrofagów M1, powodując wolniejsze usuwanie martwiczych resztek i przedłużoną martwicę. Wyniki naszych badań pokazały, że negatywny wpływ SIM na fazę naprawy związany jest z zaburzeniem aktywności MPCs i ich fuzji z tworzeniem miotub oraz zaburzeniem powstawania nowych miocytów. Uzyskane wyniki badań w znaczący sposób poszerzają wiedzę na temat skutków ubocznych SIM i dostarczają dowodów na wystąpienie ryzyka upośledzenia procesu regeneracji włókien mięśniowych podczas terapii SIM, jak również innymi lekami z grupy statyn.

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

Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Maślanka T. (2018) *Simvastatin impairs the inflammatory and repair phases of the postinjury skeletal muscle regeneration*. Biomed Res Int. 2018:7617312.

4.2.4. Wpływ deksametazonu na przebieg fazy zapalenia oraz fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych

4.2.4.1. Wprowadzenie

Z uwagi na powszechne stosowanie DEX i innych glikokortykosteroidów w terapii wielu schorzeń u ludzi i zwierząt, oraz właściwości DEX, a w szczególności negatywny wpływ na szybkość gojenia się ran i funkcjonowanie mięśni szkieletowych [6, 36, 63, 84, 96], postanowiono zbadać czy istnieje ryzyko niekorzystnego oddziaływania DEX na zdolność regeneracyjną mięśni szkieletowych. W dostępnej literaturze brak jest informacji na ten temat, dlatego uzupełnienie istniejącej luki w wiedzy w tym zakresie uznano za ważne i potrzebne. Postawiliśmy hipotezę, że DEX w przebiegu regeneracji włókien mięśniowych: (a) może zakłócać fazę zapalną poprzez hamowanie odpowiedzi zapalnej uszkodzonej tkanki i zmniejszanie rekrutacji komórek zapalnych; (b) może negatywnie wpływać na fazę naprawy poprzez osłabienie rekrutacji, aktywności i różnicowania MPCs. Aby zweryfikować te hipotezy, celem niniejszych badań było określenie wpływu stosowania DEX na przebieg fazy zapalenia i fazy naprawy procesu regeneracji eksperymentalnie uszkodzonych mięśni szkieletowych. W celu zbadania mechanizmów leżących u podstaw potencjalnego działania przeciwregeneracyjnego DEX przeanalizowano jego wpływ na następujące parametry: (a) obecność i stopień wynaczynienia, (b) obecność i stopień martwicy, (c) obecność i intensywność nacieku zapalnego, (d) średnią liczbę MPCs, (e) średnią liczbę miotub oraz (f) średnią liczbę młodych włókien.

4.2.4.2. Materiały i metody

Eksperyment przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych, uzyskując zgodę na jego wykonanie od Lokalnej Komisji Etycznej na podstawie Uchwały nr 62/2010. Badania przeprowadzono na 48 loszkach rasy wielkiej białej polskiej w wieku około 3 miesięcy. Zwierzęta podzielono losowo na 2 grupy: grupa kontrolna (24 loszki), tj. zwierzęta nieotrzymujące DEX oraz grupa eksperymentalna (24 loszki), tj. otrzymująca domięśniowo DEX (Rapidexon 2 mg/ml, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Holandia) od pierwszego do ostatniego dnia doświadczenia w dziennej dawce 0,2 mg/kg. Dawkę DEX ustalono na podstawie innych badań dotyczących efektów terapii DEX przy użyciu modelu świni [32, 105], jak również mając na uwadze górny zakres dawki przeciwzapalnej DEX stosowanej u ludzi i docelowych gatunków weterynaryjnych [12, 33, 68]. Zwierzętom z grupy kontrolnej w formie iniekcji domięśniowej podawano 3,5 ml roztworu soli (objętość

odpowiadająca średniej objętości dawki podawanego preparatu) w miejscu odpowiadającym podawaniu DEX. W 15 dniu eksperymentu (dzień 0) u wszystkich zwierząt obu grup, w tym samym dniu, dokonano obustronnego (po obu stronach kręgosłupa) uszkodzenia mięśnia najdłuższego lędźwi za pomocą pojedynczej iniekcji 10 ml 0,5% BPVC, według procedury opisanej w punkcie 4.2.2.2. Następnie po 3 zwierzęta z każdej grupy w kolejnych dniach po uszkodzeniu tj. w dniu 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 poddano eutanazji, według procedury opisanej w punkcie 4.2.2.2.

Wszystkie procedury związane z pobieraniem po eutanazji próbek mięśni z miejsc uszkodzenia prawego i lewego mięśnia najdłuższego lędźwi, oraz ich przygotowaniem i wykonaniem barwień histopatologicznych oraz immunohistochemicznych były zgodne z opisanymi w punkcie 4.2.3.2.

Regeneracja włókien mięśniowych została oceniona na podstawie obserwacji zjawisk towarzyszących fazie zapalenia i fazy naprawy według kryteriów opisanych w punkcie 4.2.3.2.

Analizy statystycznej uzyskanych danych dokonano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.2.3.2.

4.2.4.3. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki badań wskazują, że DEX negatywnie wpłynął na pouszkodzeniową regenerację włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. W fazie zapalenia DEX znacząco zwiększył rozmiar wynaczynienia i spowodował przedłużone jego obecności w miejscu uszkodzenia mięśni, ponadto przedłużył obecność martwicy i nacieku zapalnego. W fazie naprawy DEX opóźnił i przedłużył obecność MPCs, upośledził i przedłużył proces tworzenia miotub oraz opóźnił tworzenie młodych włókien mięśniowych. Ponieważ oceniane parametry fazy zapalenia w sposób istotny różniły się z danymi uzyskanymi w grupie kontrolnej, a analiza parametrów fazy naprawy wykazała mniej istotnych różnic pomiędzy grupami, należy przyjąć, że DEX w większym stopniu wpłynął na procesy zachodzące w fazie zapalnej niż na procesy zachodzące podczas fazy naprawy regeneracji.

Destabilizacja bariery komórek śródbłonna przez DEX, która przejawiała się ekstensywnym wynaczynieniem i jego przedłużoną obecnością w miejscu iniekcji BPVC, była jednym z zaskakujących wyników naszych badań. Podobnie wyniki innych badań dotyczących zaburzeń przepuszczalności naczyń pod wpływem DEX są kontrowersyjne i rozbieżne, nawet jeśli dotyczą tej samej dawki leku [7, 15, 78]. Wykazano również, że w warunkach niedotlenienia w przypadku ostrego udaru niedokrwienego lub ostrego uszkodzenia tkanek, DEX jest nieskuteczny lub nawet szkodliwy dla funkcjonowania bariery jaką jest śródbłonek

naczyniowy [78]. Podobne objawy występują w uszkodzonym przez iniekcję BPVC mięśniu, gdzie niedotlenienie jest następstwem krótkotrwałego skurczu naczyń krwionośnych, a następnie ich rozszerzenia i zwiększania przepuszczalności [59]. W oparciu o uzyskane wyniki i biorąc pod uwagę fakt, że rozległość wynaczynienia krwi podczas stosowania DEX była istotnie większa niż w grupie kontrolnej, należy założyć, że w warunkach niedokrwienia tkanki DEX niekorzystnie wpływa na integralność bariery śródbłonkowej w mięśniach szkieletowych. Uzyskane wyniki badań pokazały, że DEX nie wpłynął na nasilenie martwicy podczas pierwszych dwóch dni regeneracji. Dlatego można wyciągnąć wniosek, że DEX nie zapobiegł uszkodzeniom mięśni, ani nie wykazał działania miotoksycznego na tym etapie regeneracji. To stwierdzenie jest zgodne z wynikami innych badań przeprowadzonych u ludzi i zwierząt [63, 69]. Jednak od 3 dnia regeneracji do końca eksperymentu, martwica była bardziej rozległa u zwierząt traktowanych DEX w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej, ponadto towarzyszyła jej wysoka liczba komórek zapalnych, co również obserwowano w tym punkcie czasowym w grupie DEX. Co zaskakujące, przez pierwsze dwa dni (czas aktywności neutrofilii) DEX nie wpływał na intensywność zapalenia, co oznacza, że nie wykazał działania przeciwzapalnego na początku regeneracji mięśni szkieletowych. Co więcej, wydaje się, że DEX wywołał wzmocnienie stanu zapalnego w późniejszym etapie fazy zapalenia. Ten wynik mógł być spowodowany antyapoptotycznym działaniem DEX na neutrofile, co przyczyniło się do przedłużenia obecności tych komórek zapalnych w miejscu uszkodzenia mięśni. Takie antyapoptotyczne działanie DEX na neutrofile potwierdzono w badaniach *in vitro*, jednak dokładny mechanizm tego działania jest nadal przedmiotem dyskusji [14, 76]. Postawiona została także hipoteza, że przedłużone zapalenie obserwowane w czasie stosowania DEX może być skutkiem zwiększenia populacji makrofagów spowodowanej przez DEX, a takie działanie potwierdzili inni badacze [2, 41]. Ponieważ stwierdzonej w kolejnych dniach doświadczenia znacząco wyższej liczbie komórek zapalnych w grupie traktowanej DEX w porównaniu z grupą kontrolną, towarzyszyła rozległa martwica, wysunięto hipotezę, że DEX mógł zmniejszyć aktywność fagocytarną makrofagów, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [4, 47, 58, 110]. Ponadto dodatkową przyczyną wolniejszego, w porównaniu z grupą kontrolną, uprzątnięcia martwiczej kruszywa komórkowego podczas stosowania DEX może być indukowane lekiem zwiększone przesunięcie fenotypu makrofagów z fagocytyjnego M1 w kierunku nefagocytyjnego M2. Ta właściwość DEX została potwierdzona w najnowszych badaniach [97], jednak zjawisko to nigdy nie było badane w odniesieniu do regeneracji mięśni i nie wiadomo, w jaki sposób wpływa ono na przebieg tego procesu. Badania własne wykazały również, że średnia liczba MPCs w pierwszych dniach regeneracji była znacząco niższa w

grupie traktowanej DEX w porównaniu z grupą kontrolną, co z kolei przełożyło się na opóźnienie procesu tworzenia miotub i młodych włókien w tej grupie. Nasze wyniki są zgodne z badaniami *in vitro*, w których negatywny wpływ DEX na proliferację MPCs i ich zdolność różnicowania osiągnięto przy wysokich stężeniach DEX [87, 97, 98], a prawdopodobnym mechanizmem tego działania DEX jest indukcja apoptozy i degradacji białek MPCs [26, 87, 98]. Wyniki naszych badań potwierdziły również negatywny wpływ DEX na proces tworzenia miotub i młodych włókien, co jest zgodne z wynikami badań *in vitro* przy użyciu wysokich stężeń DEX [40, 95, 98]. Jednak inne eksperymenty *in vitro* wykazały, że DEX w niskich stężeniach pozytywnie wpływa na proces miogenezy [6, 96]. Ponadto w związku z tym, że indukowanej przez DEX przedłużonej obecności MPCs w miejscu uszkodzenia towarzyszyła zwiększona liczba komórek zapalnych postawiona została hipoteza, że zjawisko to może być skutkiem wywołanej przez DEX indukcji przesunięcia makrofagów M1 w kierunku fenotypu M2 z następową trwałą stymulacją MPCs.

Reasumując, uzyskane wyniki badań własnych wykazały, że DEX może zaburzać pouszkodzeniową regenerację mięśni szkieletowych. Co więcej, wyniki sugerują, że faza zapalenia regeneracji wydaje się być bardziej dotknięta niż faza naprawy podczas stosowania DEX. DEX nie wywołał efektu przeciwzapalnego na początku fazy zapalnej, ale spowodował nasilenie zapalenia w późniejszym etapie tej fazy. Co więcej, DEX wydawał się zmniejszać aktywność fagocytarną makrofagów, co skutkowało przedłużonym usuwaniem martwiczego kruszywa komórkowego. W fazie naprawy DEX upośledził rekrutację i różnicowanie MPCs, powodując opóźnienie tworzenia miotub i młodych włókien. Wyniki te mają wielowymiarowe znaczenie zarówno dla medycyny ludzi, jak i zwierząt. Biorąc pod uwagę wszystkie obserwowane efekty DEX, należy rozważyć możliwość wystąpienia znacznego obniżenia zdolności regeneracyjnej mięśni szkieletowych podczas terapii glikokortykosteroidami. Dlatego też jego stosowanie u pacjentów z urazem mięśniowym powinno być oparte na ocenie stosunku korzyści do ryzyka, a dalsze szczegółowe badania zależnych od dawki i czasu trwania leczenia efektów ubocznych terapii DEX są niezbędne.

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

Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Gesek M. (2019) *Dexamethasone-induced impairment of post-injury skeletal muscle regeneration*. BMC Vet. Res. 15: 56.

4.2.5. Podsumowanie i wnioski

Badania mające na celu ocenę wpływu czynników o działaniu miotoksycznym i mioprotekcyjnym na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych mają znaczenie poznawcze, zarówno w kontekście naukowym, jak i klinicznym. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają pozytywny wpływ LELI, CoQ10 i witaminy E na przebieg procesu regeneracji, oraz w znacznym stopniu poszerzają wiedzę na temat mechanizmów ich działania. Ujawniają również nowy nieznaną aspekt oddziaływania SIM i DEX pod postacią upośledzenia procesu odnowy włókien mięśniowych. Ponadto, na podstawie analizy uzyskanych wyników należy stwierdzić, że mechanizm negatywnego wpływu SIM i DEX na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych jest w wielu aspektach zbieżny, chociaż wydaje się, że SIM w większym niż DEX stopniu upośledza przebieg obu faz regeneracji. Ta zbieżność wpływu obu substancji nie jest przypadkowa, ponieważ ich wybór opierał się na dokładnej analizie ich właściwości i podobnych efektach działania. Z drugiej jednak strony wydaje się, że wyniki badań w zakresie wpływu SIM i DEX, jak również pozostałych badanych czynników pokazują, że zaburzenia w krążeniu w miejscu uszkodzenia, zdolność funkcjonalna makrofagów i aktywność MPCs, są najważniejszymi, krytycznymi punktami pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Ponieważ proces regeneracji mięśni towarzyszy wielu schorzeniom, przeciążeniom oraz urazom, typowanie czynników mogących zarówno pozytywnie, jak i negatywnie wpływać na ten proces oraz poznanie dokładnych mechanizmów tego działania ma bardzo duże znaczenie zarówno w medycynie ludzi jak i zwierząt.

Podsumowania i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze ustalenia, że LELI, CoQ10 i witamina E, wykazują korzystne działanie na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych, a w szczególności na aktywność fagocytarną makrofagów oraz aktywację i proliferację MPCs.
2. LELI oraz jednoczesne podawanie CoQ10 i witaminy E korzystniej wpływa na aktywność fagocytarną makrofagów w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych w porównaniu z oddzielnym stosowaniem witaminy E i CoQ10.
3. Witamina E podawana osobno lub wspólnie z CoQ10 oraz sam CoQ10 mają korzystniejszy niż LELI wpływ na proces tworzenia miotub i młodych włókien mięśniowych w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych.

4. LELI i witamina E wykazują antyapoptotyczne działanie w stosunku do makrofagów w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych.
5. LELI wykazuje antyapoptotyczne działanie w stosunku do MPCs w przebiegu pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych.
6. SIM upośledza proces pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.
7. SIM wpływa negatywnie na fazę zapalenia, jak i fazę naprawy procesu regeneracji włókien mięśniowych.
8. W fazie zapalenia procesu regeneracji SIM zwiększa ryzyko wystąpienia przedłużonego krwawienia i nie wykazuje działania przeciwzapalnego, ponadto zmniejsza aktywność fagocytarną makrofagów, powodując wolniejsze usuwanie martwiczych resztek i przedłużenie obecności martwicy.
9. W fazie naprawy procesu regeneracji SIM zaburza aktywności MPCs oraz proces tworzenia miotub i młodych włókien.
10. DEX upośledza proces pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych.
11. DEX wpływa negatywnie na fazę zapalenia, jak i fazę naprawy procesu regeneracji włókien mięśniowych.
12. Negatywny wpływ DEX na fazę zapalenia procesu regeneracji jest większy niż na fazę naprawy.
13. W fazie zapalenia procesu regeneracji DEX powoduje destabilizację śródbłona naczyniowego z ryzykiem zwiększonego krwawienia w miejscu uszkodzenia mięśni, ponadto w pierwszym etapie tej fazy DEX nie wywołuje efektu przeciwzapalnego, w późniejszym zaś etapie nasila naciek zapalny.
14. W fazie zapalenia procesu regeneracji DEX zmniejsza aktywność fagocytarną makrofagów, powodując wolniejsze usuwanie martwiczych resztek i przedłużenie obecności martwicy.
15. W fazie naprawy procesu regeneracji DEX upośledza rekrutację i różnicowanie MPCs, powodując opóźnienie tworzenia miotub i młodych włókien.
16. Mechanizm negatywnego oddziaływania SIM i DEX na przebieg pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych jest w wielu aspektach zbieżny, jednak SIM w większym niż DEX stopniu upośledza przebieg obu faz procesu regeneracji.
17. Opracowany system punktacji do oceny zjawisk fazy zapalnej i fazy naprawy pouszkodzeniowej regeneracji mięśni, jest efektywnym narzędziem badawczym umożliwiającym monitorowanie tego procesu.

4.2.6. Piśmiennictwo

1. Akiyama C., Kobayashi S., Nonaka I. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol.* 1992; 83: 584-589.
2. Al-Bishri A., Forsgren .S, Al-Thobaiti Y., Sunzel B., Rosenquist J. Effect of betamethasone on the degree of macrophage recruitment and nerve growth factor receptor p75 immunoreaction during recovery of the sciatic nerve after injury: an experimental study in rats. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2008; 46: 455-459.
3. Alessi Pissulin C.N., Henrique Fernandes A.A., Sanchez Orellana A.M., Rossi E., Silva R.C., Michelin Matheus SM. Low-level laser therapy (LLLT) accelerates the sternomastoid muscle regeneration process after myonecrosis due to bupivacaine. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2017; 168: 30-39.
4. Becker J., Grasso R.J. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: inability of arachidonic acid, indomethacin, and nordihydroguaiaretic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor. *Int. J. Immunopharmacol.* 1985; 7: 839-847.
5. Bedi O., Dhawan V., Sharma P.L., Kumar P. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2016; 389: 695-712.
6. Belanto J.J., Diaz-Perez S.V., Magyar C.E., Maxwell M.M., Yilmaz Y., Topp K., Boso G., Jamieson C.H., Cacalano N.A., Jamieson C.A. Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul. Disord.* 2010; 20: 111-21.
7. Bellis J.R., Pirmohamed M., Nunn A.J., Loke Y.K., De S., Golder S., Kirkham J.J. Dexamethasone and haemorrhage risk in paediatric tonsillectomy: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Anaesth.* 2014; 113: 23-42.
8. Bellosta S., Via D., Canavesi M., Pfister P., Fumagalli R., Paoletti R., Bernini F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 1671-1678.
9. Ben-Dov N., Shefer G., Irintchev A., Wernig A., Oron U., Halevy O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1448: 372-380.
10. Bibikova A., Oron U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Lasers Surg. Med.* 1994; 14: 355 -361.
11. Bliznakov E., Casey A., Premuzic E. Coenzymes Q: stimulants of the phagocytic activity in rats and immune response in mice. *Experientia.* 1970; 26: 953-9554.
12. Boothe D.M., Mealey K.A. Drugs targeting inflammation or immunomodulation: Glucocorticoids and mineralocorticoids. In: Boothe DM, editor. *Small animal clinical pharmacology & therapeutics.* 2nd ed., St. Louis: Elsevier Saunders; 2012. p.1119-1149.
13. Bouitbir J., Singh F., Charles A.L., Schlagowski A.I, Bonifacio A., Echaniz-Laguna A., Geny B., Krähenbühl S., Zoll J. Statins Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Glycolytic Skeletal Muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 2016; 10: 84-98.
14. Brazil T.J., Dixon P.M., Haslett C., Murray J., McGorum B.C. Constitutive apoptosis in equine peripheral blood neutrophils in vitro. *Vet. J.* 2014; 202: 536-542.

15. Brigger M.T., Cunningham M.J., Hartnick C.J. Dexamethasone administration and postoperative bleeding risk in children undergoing tonsillectomy. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 136: 766-772.
16. Bruckert E., Hayem G., Dejager S., Yau C., Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005; 19: 403-414.
17. Bulyakova N., Zubkova S., Azarova V. Laser therapy of irradiated traumatized skeletal muscles and state of immune system in animals. *J. Biol. Sci.* 2011; 11: 37-47.
18. Caramori G., Adcock I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2005; 4: 455-63.
19. Ceafalan L.C., Popescu B.O., Hinescu M.E. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 957014.
20. Chazaud B., Sonnet C., Lafuste P., Bassez G., Rimaniol A.C., Poron F., Authier F.J., Dreyfus P.A., Gherardi R.K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell. Biol.* 2003; 163: 1133-1143.
21. Chello M., Anselmi A., Spadaccio C., Patti G., Goffredo C., Di Sciascio G., Covino E. Simvastatin increases neutrophil apoptosis and reduces inflammatory reaction after coronary surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 2007; 83:1374-1380.
22. Chen C.C., Liou S.W., Chen C.C., Chen W.C., Hu F.R., Wang I.J., Lin S.J. Coenzyme Q10 reduces ethanol-induced apoptosis in corneal fibroblasts. *PLoS One.* 2011; 6: 19111.
23. Çoban N., Güleç Ç., Özsait-Selçuk B., Erginel-Ünaltuna N. Role of simvastatin and ROR α activity in the macrophage apoptotic pathway. *Anatol. J. Cardiol.* 2017; 17: 362-366.
24. Davies J.T., Delfino S.F., Feinberg C.E., Johnson M.F., Nappi V.L., Olinger J.T., Schwab A.P., Swanson H.I. Current and emerging uses of statins in clinical therapeutics: A review. *Lipid Insights.* 2016; 14: 13-29.
25. Durmus M., Karaaslan E., Ozturk E., Gulec M., Iraz M., Edali N., Ersoy M.O. The effects of single-dose dexamethasone on wound healing in rats. *Anesth. Analg.* 2003; 9: 1377-1380.
26. Gokulakrishnan G., Chang X., Fleischmann R., Fiorotto M.L. Precocious glucocorticoid exposure reduces skeletal muscle satellite cells in the fetal rat. *J. Endocrinol.* 2017; 232: 561-72.
27. Greenwood J., Mason J.C. Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends. Immunol.* 2007; 28: 88-98.
28. Groneberg D.A., Kindermann B., Althammer M., Klapper M., Vormann J., Littarru G.P., Döring F. Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005; 37: 1208-1218.
29. Grounds M.D. Therapies for sarcopenia and regeneration of old skeletal muscles: more a case of old tissue architecture than old stem cells. *Bioarchitecture.* 2014; 4: 81-87.
30. Guney M., Oral B., Take G., Giray S.G., Mungan T. Effect of fluoride intoxication on endometrial apoptosis and lipid peroxidation in rats: Role of vitamins E and C. *Toxicol.* 2007; 231: 215-223.

31. Haendeler J., Zhiher A.M., Dimmeler S. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 317: 407-411.
32. Holopainen R., Laine J., Halkola L., Aho H., Kääpä P. Dexamethasone treatment attenuates pulmonary injury in piglet meconium aspiration. *Pediatr. Res.* 2001; 49: 162-68.
33. Hsu W.H. Appendix II: Dosage table. In: Hsu WH, editor. *Handbook of veterinary pharmacology*. 1st ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 489-536.
34. Hu M., Cheung B.M., Tomlinson B. Safety of statins: an update. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2012; 3: 133-144.
35. Iuchi T., Akaike M., Mitsui T., Ohshima Y., Shintani Y., Azuma H., Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2003; 92: 81-87.
36. Kaasik P., Umnova M., Pehme A., Alev K., Aru M., Selart A., Seene T. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007; 105: 85-90.
37. Kagan T., Davis C., Lin L., Zakeri Z. Coenzyme Q10 can in some circumstances block apoptosis, and this effect is mediated through mitochondria. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1999; 887: 31-47.
38. Kami K., Senba E. In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 1579-1589.
39. Karalaki M., Fili S., Philippou A., Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo.* 2009; 23: 779-796.
40. Kim J., Park M.Y., Kim H.K., Park Y., Whang K.Y. Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway in C2C12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016; 21: 1-7.
41. Kimura M., Sugaya N., Kimata K., Kawachi M., Sawada M., Kuroda H., Takei M., Inafuku S., Wu M-D. Effects of dexamethasone on tissue injury and reconstruction in ethanol/steroid injection therapy for allergic rhinitis. *J. Aller. Ther.* 2012; doi:10.4172/2155-6121.S5-005 5.
42. Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A., Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2015; 36: 377-393.
43. Kwak H.B., Thalacker-Mercer A., Anderson E.J., Lin C.T., Kane D.A., Lee N.S., Cortright R. N., Bamman M.M., Neuffer P.D. Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52:198-207.
44. Lawson-Smith M.J., McGeachie J.K. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J. Anat.* 1998; 192: 161-171.
45. Laumonier T., Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J. Exp. Orthop.* 2016; 3: 15.
46. Liu J., Saul D., Böker K.O., Ernst J., Lehman W., Schilling A.F. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 1984879.

47. Liu X., Han Q., Sun R., Li Z. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in experimental pneumococcal meningitis. *Brain. Res.* 2008; 1207: 237-243.
48. Luz M.A., Marques M.J., Santo Neto H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35: 691-695.
49. Martini C., Trapani L., Narciso L., Marino M., Trentalance A., Pallottini V. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase increase is essential for rat muscle differentiation. *J. Cell Physiol.* 2009; 220: 524-530.
50. Maślanka T. Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle - In vivo investigations. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96: 338-346.
51. Margaritis M., Channon K.M., Antoniades C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 20: 1198-1215.
52. Masters B.A., Palmoski M.J., Flint O.P., Gregg R.E., Wang-Iverson D., Durham S.K. In vitro myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 131: 163-174.
53. Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000; 32: 157-170.
54. Mikashinovich Z.I., Belousova E.S., Sarkisyan O.G. Impairment of energy-dependent processes in the muscle tissue as a pathogenetic mechanism of statin-induced myopathy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 162: 433-435.
55. Moraes L.A., Vaiyapuri S., Sasikumar P., Ali M.S., Kriek N., Sage T., Gibbins J.M. Antithrombotic actions of statins involve PECAM-1 signaling. *Blood.* 2013; 122: 3188-96.
56. Morgan J.E., Partridge T.A. Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 35: 1151-6.
57. Murray T.V., McMahon J.M., Howley B.A., Stanley A., Ritter T., Mohr A., Zwacka R., Fearnhead H.O. A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J. Cell Sci.* 2008; 121: 3786-3793.
58. Nakamura Y., Murai T., Ogawa Y. Effect of in vitro and in vivo administration of dexamethasone on rat macrophage functions: comparison between alveolar and peritoneal macrophages. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 301-306.
59. Newton D.J., McLeod G.A., Khan F., Belch J.J. Vasoactive characteristics of bupivacaine and levobupivacaine with and without adjuvant epinephrine in peripheral human skin. *Br. J. Anaesth.* 2005; 94: 662-67.
60. Nonaka I., Fujita T., Sugita H. Regenerative capability of skeletal muscle in chicken muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 1984; 7: 400-407.
61. Oesterle A., Laufs U., Liao J.K. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ. Res.* 2017; 120: 229-243.
62. Ognjanović B.I., Marković S.D., Pavlović S.Z., Zikić R.V., Stajin A.Š., Saičić Z.S. Combined effects of coenzyme Q(10) and Vitamin E in cadmium induced alterations of antioxidant defense system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006; 22: 219-224.
63. Oshima Y., Kuroda Y., Kunishige M., Matsumoto T., Mitsui T. Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. *Muscle Nerve.* 2004; 30: 49-54.

64. Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Karpińska J., Purzyńska-Pugacewicz A., Kasperowicz B., Mikołajczyk A., Babińska I. The effect of coenzyme Q10 and vitamin E on the regeneration of skeletal muscles in pigs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004; 7: 295-303.
65. Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Kasperowicz B., Karpińska J., Purzyńska-Pugacewicz A. Influence of vitamin E and coenzyme Q10 on the proliferation and morphological pattern of hepatocytes in piglets. *Med. Weter.* 2003; 59: 930-934.
66. Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Podbielski M., Wiśniewska A., Drzewiecka A. Effect of butaphosphane and cyanocobalamin on regeneration of muscle fibres in pigs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009; 12: 329-338.
67. Otrocka-Domagala I. Sensitivity of skeletal muscle to pro-apoptotic factors. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011; 14: 683-694.
68. Papich M.G. Dexamethasone. In: Papich MG, editor. *Saunders handbook of veterinary drugs*. 3rd ed. St. Louis: Elsevier-Saunders; 2011. p. 207-209.
69. Patrão-Neto F.C., Tomaz M.A., Strauch M.A., Monteiro-Machado M., Rocha J.R. Jr, Borges P.A., Calil-Elias S., Melo P.P. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of Bothrops venoms. *Toxicon* 2013; 69: 55-64.
70. Pierno S., Didonna M.P., Cippone V., De Luca A., Pisoni M., Frigeri A., Nicchia G.P., Svelto M., Chiesa G., Sirtori C., Scanziani E., Rizzo C., De Vito D., Conte Camerino D. Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 149: 909-919.
71. Pignatelli P., Carnevale R., Pastori D., Cangemi R., Napoleone L., Bartimoccia S., Nocella C., Basili S., Violi F. Immediate antioxidant and antiplatelet effect of atorvastatin via inhibition of Nox2. *Circulation.* 2012; 126: 92-103.
72. Podbielski M., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T. Effects of laser light on regenerating muscle fibres in pigs. *Med. Weter.* 2006; 62: 1158-1163.
73. Ramanathan K., Anusuyadevi M., Shila S., Panneerselvan C. Ascorbic acid and alfa-tocopherol as potent modulators of apoptosis on arsenic induced toxicity in rats. *Toxicol. Lett.* 2005; 156: 297-306.
74. Rennó A.C., Toma R.L., Feitosa S.M., Fernandes K., Bossini P.S., de Oliveira P., Parizotto N., Ribeiro D.A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed. Laser Surg.* 2014; 29: 5-10.
75. Rodrigues N.C., Brunelli R., Abreu D.C., Fernandes K., Parizotto N.A., Renno A.C. Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. *Braz. J. Phys. Ther.* 2014; 8: 395-401.
76. Saffar A.S., Ashdown H., Gounni A.S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr. Drug Targets.* 2011; 12: 556-62.
77. Sakakima H., Kamizono T., Matsuda F., Izumo K., Ijiri K., Yoshida Y. Midkine and its receptor in regenerating rat skeletal muscle after bupivacaine injection. *Acta Histochem.* 2006; 108: 357-64.
78. Salvador E., Shityakov S., Förster C. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. *Cell Tissue Res.* 2014; 355: 597-605.

79. Santos L.L., Morand E.F. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 399: 1-7.
80. Schiaffino S., Pereira M.G, Ciciliot S., Rovere-Querini P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 2017; 284: 517-524.
81. Seene T., Kaasik P., Riso E.M. Review on aging, unloading and reloading: changes in skeletal muscle quantity and quality. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2012; 54: 374-80.
82. Selsby J.T., Ross J.W., Nonneman D., Hollinger K. Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR J.* 2015; 56: 116-126.
83. Shaltouki A., Freer M., Mei Y., Weyman C.M. Increased expression of the pro-apoptotic Bcl2 family member PUMA is required for mitochondrial release of cytochrome C and the apoptosis associated with skeletal myoblast differentiation. *Apoptosis* 2007; 12: 2143-2154.
84. Sharif F., Steenbergen P.J., Metz J.R., Champagne D.L. Long-lasting effects of dexamethasone on immune cells and wound healing in the zebrafish. *Wound Repair Regen.* 2015; 23:855-865.
85. Shefer G., Oron U., Irintchev A., Wernig A., Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J. Cell Physiol.* 2001; 187: 73-80.
86. Shefer G., Partridge T.A., Heslop L., Gross J.G., Oron U., Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 1461-1469.
87. Singleton J.R., Baker B.L., Thorburn A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* 2000; 141: 2945-2950.
88. Sirvent P., Fabre O., Bordenave S., Hillaire-Buys D., Raynaud De Mauverger E., Lacampagne A., Mercier J. Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 259: 263-268.
89. Sloff M., de Vries R., Geutjes P., IntHout J., Ritskes-Hoitinga M., Oosterwijk E, Feitz W. Tissue engineering in animal models for urinary diversion: a systematic review. *PLoS One.* 2014; 9:e98734.
90. Sloff M., Simaioforidis V., Geutjes P.J., Hoogenkamp H.R., van Kuppevelt T.H., Daamen W.F., Oosterwijk E., Feitz W.F. Novel tubular constructs for urinary diversion: a biocompatibility study in pigs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017; 11: 2241-2249.
91. Sloff M., Simaioforidis V., Tiemessen D.M., Janke H.P., Kortmann B.B., Roelofs L.A., Geutjes P.J., Oosterwijk E., Feitz W.F. Tubular Constructs as Artificial Urinary Conduits. *J. Urol.* 2016; 196: 1279-1286.
92. Snäll J., Kormi E., Koivusalo A.M., Lindqvist C., Suominen A.L., Törnwall J., Thorén H. Effects of perioperatively administered dexamethasone on surgical wound healing in patients undergoing surgery for zygomatic fracture: a prospective study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2014; 117: 685-89.
93. Sonnet C., Lafuste P., Arnold L., Brigitte M., Poron F., Authier F.J., Chrétien F., Gherardi R.K., Chazaud B. Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J. Cell Sci.* 2006; 119: 2497-2507.
94. Swindle M.M., Makin A., Herron A.J., Clubb F.J. Jr., Frazier K.S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 2012; 49: 344-356.

95. Sun L., Trausch-Azar J.S., Muglia L.J., Schwartz A.L. Glucocorticoids differentially regulate degradation of MyoD and Id1 by N-terminal ubiquitination to promote muscle protein catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 3339-3344.
96. Syverud B.C., VanDusen K.W., Larkin L.M. Effects of Dexamethasone on Satellite Cells and Tissue Engineered Skeletal Muscle Units. *Tissue Eng. Part A.* 2016; 22: 480-489.
97. Tedesco S., Bolego C., Toniolo A., Nassi A., Fadini G.P., Locati M., Cignarella A. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology.* 2015; 220: 545-554.
98. te Pas M.F., de Jong P.R., Verburg F.J. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. *Mol. Biol. Rep.* 2000; 27: 87-98.
99. Thomas S.R., Neuzil J., Stocker R. Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 687-696.
100. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17:165-178.
101. Trapani L., Segatto M., La Rosa P., Fanelli F., Moreno S., Marino M., Pallottini V. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition impairs muscle regeneration. *J. Cell. Biochem.* 2012; 113: 2057-2063.
102. Tuomisto T.T., Lumivuori H., Kansanen E., Häkkinen S.K., Turunen M.P., van Thienen J. V., Horrevoets A.J., Levonen A.L., Ylä-Herttuala S. Simvastatin has an anti-inflammatory effect on macrophages via upregulation of an atheroprotective transcription factor, Kruppel-like factor 2. *Cardiovasc Res.* 2008; 78:175-184.
103. Turner N.J., Badylak S.F. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 2012; 347: 759-774.
104. Violi F., Calvieri C., Ferro D., Pignatelli P. Statins as antithrombotic drugs. *Circulation.* 2013; 127: 251-257.
105. Ward W.E., Donovan S.M., Atkinson S.A. Dexamethasone-induced abnormalities in growth and bone metabolism in piglets are partially attenuated by growth hormone with no synergistic effect of insulin-like growth factor-I. *Pediatr. Res.* 1998; 44: 215-21.
106. Weiss N., Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat. Embryol.* 1992; 186: 497 -503.
107. Wojtysiak D., Paściak P., Migdał W., Połtowicz K. Histochemical profile of two parts of longissimus dorsi muscle in relation to sex of fatteners. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2004; 22: 587-593.
108. Yablonka-Reuveni Z., Nameroff M. Temporal differences in desmin expression between myoblasts from embryonic and adult chicken skeletal muscle. *Differentiation.* 1990; 45: 21–28.
109. Yu J.G., Sewright K., Hubal M.J., Liu J.X., Schwartz L.M., Hoffman E.P., Clarkson P.M. Investigation of gene expression in C(2)C(12) myotubes following simvastatin application and mechanical strain. *J. Atheroscler. Thromb.* 2009; 16: 21-29.
110. Zeng S., Qiao H., Lv X.W., Fan D., Liu T., Xie D. High-dose dexamethasone induced LPS-stimulated rat alveolar macrophages apoptosis. *Drug Des. Devel. Ther.* 2017; 11: 3097-3104.

111. Zhang C.P., Li S.D., Chen Y., Jiang Y.M., Chen P., Wang C.Z., Fu X.B., Kang H.X., Shen B.J., Liang J. Stimulative effects of low intensity He-Ne laser irradiation on the proliferative potential and cell-cycle progression of myoblasts in culture. *Int. J. Photoenergy*. 2014; 2014: 205839.
112. Zielińska K.A., Van Moortel L., Opdenakker G., De Bosscher K., Van den Steen P.E. Endothelial Response to Glucocorticoids in Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 2016; 7: 592.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Wykaz i omówienie publikacji naukowych opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

5.1.1. Wpływ suplementacji substancjami o właściwościach antyoksydacyjnych na przebieg procesu regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych oraz morfologię i aktywność proliferacyjną komórek wątrobowych

W trakcie realizacji studiów doktoranckich zainteresowałam się w sposób szczególny tematyką procesu regeneracji mięśni szkieletowych, która stała się później jednym z głównych nurtów moich zainteresowań naukowych. Celem moich pierwszych badań było prześledzenie wpływu stosowania substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, tj. CoQ10 i witaminy E na przebieg procesu regeneracji mięśnia najdłuższego lędźwi po uszkodzeniu za pomocą pojedynczej iniekcji 0,5% roztworu chlorowodoru bupiwakainy (BPVC) z wykorzystaniem modelu świni. Celem podjętych badań było również wykazanie korelacji między poziomem CoQ10 i witaminy E w plazmie, a poziomem w uszkodzonej i nieuszkodzonej tkance mięśniowej. Uzyskane wyniki pokazały, że zarówno CoQ10, jak i witamina E mają pozytywny wpływ na przebieg procesu regeneracji włókien mięśniowych. Nie chronią tkanki mięśniowej przed destrukcyjnym działaniem BPVC, ale wzmagając aktywność fagocytarną makrofagów przyczyniają się do szybszego uprzątnięcia martwych włókien. Szczególnie korzystny wpływ na aktywność makrofagów okazał się mieć CoQ10. Okazało się również, że zarówno CoQ10, jak i witamina E nie chronią śródbłonnka naczyń krwionośnych przed uszkodzeniem, mają jednak dodatni wpływ na proces rewaskularyzacji. Obie substancje, a szczególnie CoQ10, dodatkowo wpłynęły na aktywność proliferacyjną komórek miogenicznych, proces tworzenia miotub oraz powstawanie i dojrzewanie młodych włókien. Uzyskane wyniki pokazały zatem, że na przebieg regeneracji uszkodzonego mięśnia większy wpływ ma CoQ10 niż witamina E. Wyniki badań chromatograficznych wykazały, że stosowanie samego CoQ10, jak również łącznie z witaminą E spowodowało znaczący wzrost poziomów witaminy E w plazmie, mięśniach uszkodzonych

oraz nieuszkodzonych. Poziomy CoQ10 w plazmie, mięśniach uszkodzonych oraz nieuszkodzonych były bardziej stabilne i w mniejszym stopniu różniły się pomiędzy grupami, zaobserwowano jednak, że były one wyższe w mięśniach uszkodzonych przy stosowaniu CoQ10 i witaminy E. Tę ciekawą zależność pomiędzy stosowaniem CoQ10, a wzrostem poziomu witaminy E w tkankach zaobserwowali również inni badacze, sugerując pozytywny wpływ CoQ10 na regenerację i wychwytywanie witaminy E. Podobnie zauważono, że stosowanie witaminy E podnosi koncentrację endogennego koenzymu Q w tkankach.

Wyniki powyższych badań przedstawiłam w rozprawie doktorskiej pt. „*Wpływ koenzymu Q10 i witaminy E na regenerację mięśni szkieletowych u świń*” (promotor: prof. dr hab. Tadeusz Rotkiewicz), którą obroniłam 07.06.2002 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Część uzyskanych wyników badań została opublikowana w późniejszej pracy (5.1.1.1). Uzyskane wyniki zainspirowały mnie również do kontynuacji badań nad mechanizmami leżącymi u podstawy działania CoQ10 i witaminy E na regenerujące włókna mięśniowe, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska apoptozy komórek. Postawiłam hipotezę, że mioprotekcyjne działanie CoQ10 i witaminy E związane jest z hamowaniem apoptozy komórek w przebiegu naprawy włókien mięśniowych. Celem weryfikacji postawionej hipotezy badawczej przeprowadziłam w późniejszym okresie badania w tym zakresie, wyniki których przedstawiłam w pracy 4.1.1. wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego.

5.1.1.1. **Odrocka-Domagala I.,** Rotkiewicz T., Karpińska J., Purzyńska-Pugacewicz A., Kasperowicz B., Mikołaczyk A., Babińska I. (2004) *The effect of coenzyme Q10 and vitamin E on the regeneration of skeletal muscles in pigs*. Pol. J. Vet. Sci. 4: 295-303. (MNiSW₂₀₀₄ 6; IF₂₀₀₄ 0)

W kolejnych badaniach postanowiłam dokonać oceny wpływu witaminy E i CoQ10 na morfologię i proliferację komórek wątrobowych prosiąt wraz z oceną poziomów obu substancji w plazmie zwierząt. Wyniki badań pokazały, że CoQ10 powoduje zaburzenia w krążeniu w wątrobie oraz zmiennego stopnia zmiany wsteczne w hepatocytach. Ten niekorzystny efekt CoQ10 był mniejszy przy łącznym podawaniu z witaminą E oraz samej witaminy E. Wyniki te były zgodne z wynikami innych autorów, którzy również zaobserwowali pozytywny wpływ witaminy E na morfologię wątroby. Przyczyn leżących u podstawy niekorzystnego wpływu CoQ10 na układ krążenia oraz hepatocyty nie ustalono, a w dostępnej literaturze brak jest informacji w tym zakresie, może mieć on jednak związek z metabolizmem CoQ10 w wątrobie. Aktywność SDH i LDH w hepatocytach była znacząco wyższa we wszystkich grupach eksperymentalnych w porównaniu z grupą kontrolną.

Stwierdzone zjawisko miało najprawdopodobniej związek z metabolizmem podawanych środków. Wyniki dotyczące aktywności proliferacyjnej komórek wątrobowych pokazały, że podawanie CoQ10 korzystnie wpływa na tę aktywność. Mniejszy wpływ CoQ10 na proliferację hepatocytów obserwowano przy jednoczesnym stosowaniu z witaminą E. Równie zaskakującym wynikiem, było wyraźne obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek wątrobowych u zwierząt traktowanych witaminą E. Ten efekt witaminy E został również potwierdzony przez innych badaczy. Badanie poziomów obu substancji w osoczu wykazało ich wzrost u zwierząt eksperymentalnych. Uzyskane wyniki pokazały, że jednoczesne stosowanie CoQ10 i witaminy E powoduje wzajemny wzrost tych substancji w osoczu.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w późniejszym okresie w następującej pracy oryginalnej:

- 5.1.1.2. **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Kasperowicz B., Karpińska J., Purzyńska-Pugacewicz A. (2003) *Influence of vitamin E and coenzyme Q10 on the proliferation and morphological pattern of hepatocytes in piglets*. Med. Weter. 59: 930-934. (MNiSW₂₀₀₃ 10; IF₂₀₀₃ 0,236)

5.1.2. Zapalenia kłębuszków nerkowych u bydła zakażonego wirusem białaczki (BLV)

W okresie studiów doktoranckich wzięłam również udział w badaniach nad zmianami morfologicznymi kłębuszków nerkowych u bydła rasy czarno-białej, zakażonego wirusem białaczki (BLV). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że u bydła zakażonego BLV najczęściej występuje zapalenie błoniaste, mezangialno-rozplemowe oraz endokapilarne kłębuszków nerkowych. Liczba zajętych zmianami kłębuszków, oraz stopień nasilenia zmian wzrastał proporcjonalnie do czasu trwania infekcji i towarzyszył mu zmiennie obfity naciek komórek zapalnych w tkance śródmiąższowej nerek. Najcięższe zmiany, łącznie ze sklerotyzacją pętli nacyniowych obserwowano u zwierząt poddanych ubojowi po dwóch latach od momentu stwierdzenia infekcji BLV. Wyniki naszych badań potwierdziły obserwacje innych badaczy, którzy również obserwowali zapalenia kłębuszków nerkowych u bydła zakażonego wirusem białaczki, nawet u sztuk niewykazujących objawów chorobowych. Ciekawym wynikiem było zaobserwowanie zmian w kłębuszkach nerkowych u niezainfekowanego, zdrowego bydła. Podobne zjawisko zaobserwowali również inni autorzy, sugerując, że stopień nasilenia glomerulopatii u bydła hodowlanego wrasta wraz z wiekiem.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w późniejszym okresie w następującej pracy oryginalnej:

5.1.2.1. Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Babińska I. (2003) *Histopathological examination of renal glomerules in cattle infected with bovine leukemia virus*. Pol. J. Nat. Sci. 2: 571-578. (MNiSW₂₀₀₃ 3; IF₂₀₀₃ 0)

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Badania nad wpływem wybranych czynników o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym, proapoptycznym i miotoksycznym na przebieg procesu regeneracji włókien mięśni poprzecznie prążkowanych

Jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych zostałam zatrudniona w Katedrze Anatomii Patologicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, kierowanej przez prof. dr hab. Tadeusza Rotkiewicza, w której pracuję do chwili obecnej pełniąc funkcję kierownika Katedry. Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania nad zjawiskiem procesu regeneracji mięśni szkieletowych i możliwością jego modulacji pod wpływem różnych czynników. Wzięłam udział w badaniach nad wpływem promieniowania emitowanego przez laser niskoenergetyczny na pouszkodzeniową regenerację (wywołaną pojedynczą iniekcją BPVC) mięśnia najdłuższego lędźwi u świń. Otrzymane wyniki badań wykazały, że biostymulacja za pomocą światła laserowego przyspieszyła proces regeneracji włókien mięśniowych, poprzez bardziej wydajną fagocytozę wynaczynionych erytrocytów oraz martwych włókien mięśniowych, jak również stymulację proliferacji komórek miogenicznych. Znacznie słabszy efekt biostymulacji zaobserwowano w przypadku procesu różnicowania mioblastów i procesu tworzenia nowych włókien. Wyniki tych badań są unikatowe i uzupełniają lukę w wiedzy na temat wpływu laseroterapii na proces odnowy tkanki mięśniowej. Efektem mojego udziału w tych badaniach była praca oryginalna 5.2.1.1. Wyniki tych badań oraz wyniki uzyskane w pracy doktorskiej (5.1.1.1.) zainspirowały mnie do podjęcia dalszych badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za mioprotekcyjne działanie laseroterapii, CoQ10 i witaminy E. Za warte poznania uznałam ustalenie wpływu tych czynników na apoptozę komórek biorących udział w procesie pouszkodzeniowej regeneracji mięśni. Ponadto zainteresowało mnie, czy skala mioprotekcyjnego efektu laseroterapii, CoQ10 i witaminy E jest porównywalna, czy też któryś z tych czynników jest szczególnie skuteczny. Aby zweryfikować tę kwestię konieczne stało się przeprowadzenie bezpośrednich badań porównawczych nad wpływem LELI, CoQ10 i witaminy E na procesy zachodzące podczas regeneracji włókien mięśniowych. Efektem tych badań była praca 4.1.1. wchodząca w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego.

5.2.1.1. Podbielski M., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T. (2006) *Effects of laser light on regenerating muscle fibres in pigs*. Med. Weter. 62: 1158-1163. (MNiSW₂₀₀₆ 15; IF₂₀₀₆ 0)

Kontynuacją moich zainteresowań dotyczących zagadnienia regeneracji mięśni szkieletowych był współdziałanie w badaniach nad wpływem butafosfanu i cyjanokobalaminy, wchodzących w skład preparatu Catosal (Bayer AG) na regenerację mięśnia najdłuższego lędźwi u świń. Postawiono hipotezę, że wpływ Catosalu na proces regeneracji mięśni szkieletowych związany jest z butafosfanem i jego zdolnością do stymulacji syntezy białek, ATP i innych związków energetycznych w komórkach, poprawy chemotaksji i fagocytozy komórek i tym samym przyspieszenia uprzątnięcia obumarłych odcinków włókien mięśniowych. Założono również, że wpływ cyjanokobalaminy na proces regeneracji mięśni, będzie zachodził poprzez poprawę metabolizmu kwasu foliowego i jego pochodnych, a także poprzez stymulację powstawania metioniny, która zapobiega m.in. uszkodzeniom włókien mięśniowych. Uzyskane wyniki badań potwierdziły korzystny wpływ preparatu Catosal na regenerację uszkodzonych mięśni szkieletowych u świń. Stosowanie Catosalu wpłynęło na przyspieszenie procesu fagocytozy martwiczych włókien przez komórki zapalne, nie wpłynęło natomiast na rozległość ognisk martwicy w pierwszych dniach regeneracji. Catosal w sposób dodatni wpłynął na aktywność proliferacyjną komórek miogenicznych, nie wykazano jednak jego wpływu na proces tworzenia miotub i młodych włókien. Uzyskane wyniki pozwoliły na znaczące poszerzenie wiedzy na temat właściwości preparatu Catosal, który był powszechnie stosowany w stanach zaburzeń przemiany materii, wyniszczenia, niedożywienia, w neuropatiach i osłabieniu aktywności skurczowej mięśni szkieletowych. Wyniki były na tyle ciekawe, że zainteresował się nim sam producent preparatu i poprosił o ich udostępnienie.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następującej pracy oryginalnej:

5.2.1.2. **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Podbielski M., Wiśniewska M., Drzewiecka A. (2009) *Effect of butaphosphane and cyanocobalamin on regeneration of muscle fibres in pigs*. Pol. J. Vet. Sci. 12: 329-338. (MNiSW₂₀₀₉ 15; IF₂₀₀₉ 0,435)

Analizując i zgłębiając mechanizmy regulujące przebieg procesu regeneracji mięśni poprzecznie prążkowanych oraz zjawiska zachodzące w mięśniach pod wpływem różnych substancji zainteresowałam się zagadnieniem procesu apoptozy i wrażliwości miocytów oraz komórek miogenicznych na działanie czynników o właściwościach proapoptotycznych. Efektem moich rozważań była praca przeglądowa (5.2.1.3.) w której poruszam ten temat. W pracy dokładnie przeanalizowałam mechanizmy i szlaki apoptozy uruchamiane w komórkach jednojądrzastych oraz komórkach wielojądrzastych, jakimi są włókna mięśniowe.

Przedstawiłam antyapoptotyczny system „obrony” jakim dysponują włókna mięśniowe, omówiłam znaczenie zjawiska autofagii w mięśniach, ponadto omówiłam wybrane substancje o potencjalnym działaniu indukującym zjawisko apoptozy w miocytach. Dojrzałe włókna mięśniowe wydają się być odporne na bodźce proapoptotyczne, ale pewne stany patologiczne np. przewlekła niewydolność serca, neuropatie, proces starzenia, miopatie uwarunkowane przez czynniki genetyczne i zapalne, czy leki miotoksyczne, mogą indukować i nasilać apoptozę. Zaprogramowana śmierć komórki odgrywa również istotną rolę w regulacji procesu regeneracji włókien mięśniowych. Szybkość i intensywność tego procesu jest określona przez właściwą równowagę między proliferacją a apoptozą w populacji komórek fagocytarnych, miogenicznych, miotubach i młodych włóknach mięśniowych. Potrzebne są zatem badania nad zjawiskiem apoptozy w przebiegu procesu regeneracji mięśni, szczególnie w warunkach ekspozycji na działanie czynników proapoptotycznych, oraz określenie komórek najbardziej wrażliwych na efekt tego działania. Zagadnienia te będą jednym z głównych tematów moich przyszłych badań.

5.2.1.3. **Otrocka-Domagala I.** (2011) *Sensitivity of skeletal muscle to pro-apoptotic factors*. Pol. J. Vet. Sci. 14: 683-694. (MNiSW₂₀₁₁ 20; IF₂₀₁₁ 0,565)

5.2.2. Badania nad wpływem DEX i SIM na morfologię wątroby oraz proliferację i apoptozę hepatocytów

Uczestniczyłam również w badaniach, których celem było określenie wpływu podawania DEX i SIM na morfologię wątroby oraz proliferację i apoptozę hepatocytów. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że podawanie DEX oraz SIM niesie ryzyko powstawania zmian wstecznych w komórkach wątrobowych oraz zaburzeń w ukrwieniu wątroby. Obie substancje wpłynęły negatywnie na aktywność proliferacyjną hepatocytów. Okazało się, że podawanie DEX wpływa na wzrost poziomu białka Bcl-2, przez co wydaje się chronić hepatocyty przed apoptozą. SIM natomiast, powodując obniżenie poziomu białka Bcl-2 oraz wzrost ekspresji wykonawczej kaspazy-3, wydaje się mieć właściwości proapoptotyczne. Ponadto, wyniki badań pokazały, że w przebiegu stosowania SIM istnieje ryzyko wystąpienia w wątrobie reakcji nadwrażliwości pod postacią nacieku eozynofili. Wyniki powyższych badań mają duże znaczenie poznawcze oraz istotne implikacje kliniczne, szczególnie w ocenie bilansu korzyści-ryzyka podczas terapii DEX i SIM, zwłaszcza w przypadku pacjentów z obniżoną wydolnością wątroby. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych 5.2.2.1. i 5.2.2.2., stanowiących cykl publikacji

będący podstawą rozprawy doktorskiej Mateusza Mikiewicza pt. „*Wpływ deksametazonu i simwastatyny na proliferację i apoptozę komórek wątrobowych u prosiąt*”. Przewód doktorski został otwarty w dniu 03.07.2014; pełnię w nim rolę promotora pomocniczego.

5.2.2.1. Mikiewicz M., **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T. (2017) *Influence of long-term, high-dose dexamethasone administration on proliferation and apoptosis in porcine hepatocytes*. Res. Vet. Sci. 112: 141-148. (MNiSW₂₀₁₆ 35; 2017 IF 1,616)

5.2.8.1. Mikiewicz M., **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K. (2019) *Influence of simvastatin on hepatocytes - histopathological and immunohistochemical study*. Pol. J. Vet. Sci. 22 (2); xxx * – praca przyjęta do druku. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₇ 0,839)

5.2.3. Badania nad procesami nowotworowymi zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem morfologii, immonofenotypowania, analizy cytomorfometrycznej, epidemiologicznej oraz czynników prognostycznych

Ze względu na to, że na co dzień zajmuję się diagnostyką zmian nowotworowych i nienowotworowych u zwierząt, w sposób szczególny zainteresowałam się onkologią. Zagadnienia onkologii zwierząt stały się zatem drugim, ważnym nurtem moich zainteresowań badawczych. Jednym z pierwszych efektów tych zainteresowań był współudział w przygotowaniu pracy przeglądowej 5.2.3.1., dotyczącej roli genów *H-ras*, *K-ras* oraz *N-ras* w transformacji nowotworowej, ze szczególnym uwzględnieniem roli ich mutacji w patogenezie nowotworów u zwierząt:

5.2.3.1. Rotkiewicz T., Słodki S., **Otrocka-Domagala I.** (2004) *The role of ras genes in the neoplastic transformation in animals*. Pol. J. Vet. Sci. 7: 47-52. (MNiSW₂₀₀₄ 6; IF₂₀₀₄ 0)

Ponadto już jako pierwszy autor brałam udział w opracowaniu pracy przeglądowej podsumowującej wyniki dotychczasowych badań dotyczących zmienności ekspresji powierzchniowych markerów leukocytów u bydła zakażonego wirusem białaczki bydła (BLV). Dotychczasowe badania pokazują, że zmiany te dotyczą głównie limfocytów B oraz w mniejszym stopniu monocytów, makrofagów i limfocytów T. Okazuje się, że u zainfekowanych zwierząt może rozwinąć się bezobjawowa białaczka aleukemiczna, ostra lub przewlekła limfocytoza spowodowana nienowotworowym rozrostem limfocytów B lub chłoniak. W związku z tym w przebiegu infekcji BLV występuje różnorodność i zmienność układu immunologicznego. Ważne jest zatem poszukiwanie dobrych narzędzi diagnostycznych

które byłyby pomocne w immunofenotypowaniu komórek, ich podziale na populacje i subpopulacje celem identyfikacji charakteru rozrostu układu limfocytarnego, jak również umożliwiłyby śledzenie przebiegu choroby oraz monitorowanie efektów podjętej terapii. Jednym z takich szybkich i precyzyjnych narzędzi diagnostycznych jest cytometria przepływowa. Rozważania te zostały opublikowane w następującej pracy przeglądowej:

5.2.3.2. **Otrocka-Domagala I.**, Słodki S., Rotkiewicz T. (2004) *Immunophenotypic variability of leukocytes in cattle infected with BLV*. Med. Weter. 60: 249-253. (MNiSW₂₀₀₄ 10; IF₂₀₁₀₄ 0,285)

Uczestniczyłam również w badaniach nad analizą patomorfologiczną, immunohistochemiczną (PCNA, p53, cytokeratyna, wimentyna) i histochemiczną (AgNOR) komórek nowotworowych i tkanki łącznej w sarkoidach u koni. Badania przeprowadzono na 50 sarkoidach, dokonano ich klasyfikacji morfologicznej, analizy pod względem miejsc występowania, jak również analizy wieku i rasy dotkniętych procesem zwierząt. Zdiagnozowano trzy typy sarkoidów: utajony, brodawkowy i fibroblastyczny. Większość badanych zmian lokalizowała się pod poprzęgiem (30%), na szyi (24%), głowie (12%) i nogach (12%). Średni wiek diagnozowanych koni wynosił 5,7 lat. Sarkoidy występowały najczęściej u klaczy (61%), dalej u wałachów (31%) i ogierów (8%), rasą dominującą była rasa wielkopolska (41%) oraz rasy mieszane z rasą wielkopolską (41%). Badane konie były głównie maści gniadej (80%). Okazało się, że najlepszymi markerami prognostycznymi rozrostu sarkoidów jest ekspresja PCNA oraz białka p53, która wiąże się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia wznowy nowotworu.

Wyniki badań opublikowano w następującej pracy oryginalnej:

5.2.3.3. Kasperowicz B., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.** (2006) *Pathomorphological and immunohistochemical study of selected markers of tumor cell proliferation in equine sarcoids*. Pol. J. Vet. 9: 109-119. (MNiSW₂₀₀₆ 6; IF₂₀₀₆ 0)

Byłam również pierwszym autorem oraz współautorem licznych publikacji opisujących przypadki różnych nowotworów u różnych gatunków zwierząt wraz z ich dokładną analizą fenotypową. Był to między innymi bardzo rzadki i wyjątkowy przypadek rozsianego chłoniaka epiteliotropowego u krowy (5.2.3.4.), pierwszy przypadek spontanicznego wrodzonego potworniaka u indyka domowego (5.2.3.5.), pierwszy przypadek wieloogniskowego mięsaka Kaposi'ego u psa (5.2.3.9.), czy skórno-mięśniakomięsaka gładkokomórkowego z przerzutami do narządów wewnętrznych u gołębia domowego (5.2.3.13). Szczególnie ważna była publikacja 5.2.3.8. której byłam pierwszym autorem, a która przedstawiała przypadek

agresywnego, rozsianego, pęcherzykowego mięśniakomięsa prążkowanokomórkowego u młodego labradora retrievera. Publikacja ta została zacytowana w bestsellerowej książce pt. „*Tumors in domestic animals*”, piątej edycji, pod redakcją Donalda J. Meutena (wydawca Wiley Blackwell, 2017), w rozdziale pt. „*Tumors of muscle*” (strona 457). Część badań dotyczyła również analizy metod diagnostycznych tj. obrazowych, histopatologicznych i cytologicznych procesów nowotworowych u zwierząt (5.2.3.6. i 5.2.3.7.).

Wyniki tych badań opublikowano w 14 pracach oryginalnych:

- 5.2.3.4. **Otrocka-Domagala I.**, Procajlo Z., Paździor K., Gesek M., Rotkiewicz T. (2012) *Immunohistochemical profile of multicentric cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with generalised lymphadenopathy in a Holstein-Friesian cow: a case report*. Vet. Med. Czech. 57: 251-257. (MNiSW₂₀₁₂ 25; IF₂₀₁₂ 0,679)
- 5.2.3.5. Paździor K, Szweda M., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T. (2012) *Extragenital teratoma in a domestic turkey (Meleagris gallopavo domestica)*. Avian Pathol. 41: 285-289. (MNiSW₂₀₁₂ 40; IF₂₀₁₂ 1,729)
- 5.2.3.6. Adamiak Z., Pomianowski A., **Otrocka-Domagala I.**, Jaskolska M.(2012) *Magnetic resonance imaging of a sacral bone with telangiectatic osteosarcoma in a dog: a case report*. Vet. Med. Czech. 57: 270-273. (MNiSW₂₀₁₂ 25; IF₂₀₁₂ 0,679)
- 5.2.3.7. Zhalniarovich Y., Adamiak Z., Przyborowska P, **Otrocka-Domagala I.** (2013) *Magnetic resonance imaging assisted with fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of fibrosarcomas of the skull in dogs*. Pol. J. Vet. Sci. 16: 583-586. (MNiSW₂₀₁₃ 20; IF₂₀₁₃ 0,712)
- 5.2.3.8. **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K., Gesek M., Koda M., Mikiewicz M., Mikolajczyk A. (2015) *Aggressive, solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma with cutaneous involvement in a juvenile Labrador Retriever*. J. Comp. Pathol. 152: 177-181. (MNiSW₂₀₁₅ 25; IF₂₀₁₅ 1,173)
- 5.2.3.9. Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Rotkiewicz T., Mikulska-Skupien E. (2015) *Kaposi-like vascular tumor of the cardiac muscle in a dog: morphological and immunohistochemical study*. Med. Weter. 71: 513-517. (MNiSW₂₀₁₅ 15; IF₂₀₁₅ 0,195)
- 5.2.3.10. Mikiewicz M., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T. (2015) *Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study*. Med. Weter. 71: 453-457. (MNiSW₂₀₁₅ 15; IF₂₀₁₅ 0,195)

- 5.2.3.11. Mikiewicz M., **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K., Gesek M., Mikolajczyk A., Blacha A. (2016) *Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumours-a report of two cases*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 40: 124-129. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₆ 0,449)
- 5.2.3.12. Mikiewicz M., **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K., Gesek M. (2016) *Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas*. Pol. J. Vet. Sci. 19: 345-352. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₆ 0,697)
- 5.2.3.13. Stenzel T., Gesek M., Pazdzior-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Koncicki A. (2017) *Cutaneous Leiomyosarcoma with multiple visceral metastases in domestic pigeon*. Avian Dis. 6 : 274-278. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₇ 1,328)
- 5.2.3.14. Pazdzior-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Mikiewicz M. (2018) *Canine oral cavity T-cell lymphoma – histopathological and immunohistochemical study*. Med. Weter. 74:70-72. (MNiSW₂₀₁₆ 15; IF₂₀₁₇ 0,197)
- 5.2.3.15. Pazdzior K., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Lew S. (2011) *Ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina) u psa – opis przypadku*. Weter. Prakt. 9: 56-58; (MNiSW₂₀₁₀ 2; IF 0)
- 5.2.3.16. Nieśpielak P., **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K., Czerski A. (2015) *Chromofobowy gruczolakorak nerki u psa - opis przypadku*. Życie Wet. 90: 377-280. (MNiSW₂₀₁₅ 4; IF 0)
- 5.2.3.17. Mączyński M., Będzłowska D., **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K. (2018) *Nowotwory macicy jeży pigmejskich – przypadek kliniczny*. Magazyn Wet. 27: 12-16. (MNiSW₂₀₁₆ 2; IF 0)

Wyniki tych badań zaprezentowano również na konferencjach międzynarodowych w postaci wykładów i doniesień opublikowanych w czasopismach z listy JCR.

Uczestniczyłam również w ważnych badaniach retrospektywnych dotyczących analizy epidemiologicznej i morfologicznej nowotworów u zwierząt. Badania przeprowadzono przy współpracy z różnymi ośrodkami badawczymi w Polsce.

Wyniki badań opublikowano w 3 pracach oryginalnych:

- 5.2.3.18. Gesek M., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Pazdzior-Czapula K., Kozłowska A., Korzeniowska P., Grochowska K., Welenc J. (2014) *Manifestation of tumours in domestic animals in Warmia and Mazury (Poland) between 2003 and 2011*. Bull. Vet. Inst. Pulawy 58: 439-446. (MNiSW₂₀₁₄ 15; IF₂₀₁₄ 0,357)

5.2.3.19. Janus I., Nowak M., Noszczyk-Nowak A., Ciaputa R., Kandefer-Gola M., Paślawska U., Sapierzyński R., Łopuszyński W., **Otrocka-Domagala I.** (2016) *Epidemiological and pathological features of primary cardiac tumours in dogs from Poland in 1970-2014*. Acta Vet. Hung. 64: 90-102. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₇ 0,814)

5.2.3.20. Kycko A., Jasik A., Bocian Ł., **Otrocka-Domagala I.**, Mikiewicz M., Śmiech A., Łopuszyński W., Dolka I., Nowak M., Madej J.A. (2016) *Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study*. J. Vet. Res. 60: 331-337. (MNiSW₂₀₁₆ 15; IF₂₀₁₇ 0,462)

Wyniki tych badań zaprezentowano również na konferencji międzynarodowej w postaci doniesienia opublikowanego w czasopiśmie z listy JCR.

Brałam również udział w badaniach and morfologią oraz immunofenotypowaniem nowotworów histiocytarnych u psów, współtworząc hipotezy badawcze oraz krytycznie analizując otrzymane wyniki. W pracy dotyczącej morfometrii histiocytów (5.2.3.21), obejmującej opis 65 przypadków histiocytomy oraz 7 przypadków ziarniniaka ropnego, wykazano, że badanie morfometryczne jest pomocne w morfologicznym różnicowaniu aktywowanych makrofagów i nowotworowych komórek Langerhansa. Wykazano ponadto, że morfologia nowotworowych komórek Langerhansa zmienia się wraz z kolejnymi stadiami regresji histiocytomy, co odzwierciedla ich dojrzewanie i różnicowanie. Natomiast w pracy dotyczącej morfologii i immunofenotypu nowotworów histiocytarnych u psów (5.2.3.22), obejmującej 71 histiocytom oraz 14 mięsaków histiocytarnych, dokonano ich identyfikacji immunofenotypowej z zastosowaniem szerokiego panelu przeciwciał (MHCII, CD18, CD79 α cy, CD3 oraz E-kadheryna). Na podstawie wyników badania immunohistochemicznego zreklasyfikowano 6 przypadków histiocytomy i aż 10 przypadków mięsaka histiocytarnego, udowadniając tym samym konieczność wdrożenia immunohistochemii do rutynowej diagnostyki nowotworów histiocytarnych. Ponadto wykazano, że spontaniczna regresja histiocytomy jest związana ze wzrostem nacieku limfocytów T oraz B, spadkiem indeksu mitotycznego komórek nowotworowych, transportem cząsteczki MHCII z cytoplazmy do błony komórkowej, jak również z utratą ekspresji E-kadheryny przez komórki nowotworowe. W dwóch przypadkach mięsaka histiocytarnego po raz pierwszy wykazano ekspresję E-kadheryny, co postawiło pod znakiem zapytania dotychczasowe poglądy na jego histogenezę. Guzy histiocytarne stanowią niejednorodną grupę proliferacyjnych zaburzeń reaktywnych oraz nowotworowych. Na podstawie wyników otrzymanych badań, oraz na podstawie dostępnej wiedzy przygotowano pracę przeglądową na temat guzów histiocytarnych u psów i kotów (5.2.3.23.).

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych (5.2.3.21., 5.2.3.22.) oraz w 1 pracy przeglądowej (5.2.3.23.):

- 5.2.3.21. Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Gesek M. (2014) *Cytomorphometry of canine cutaneous histiocytoma*. Pol. J. Vet. Sci. 17: 413-420. (MNiSW₂₀₁₄ 20; IF₂₀₁₄ 0,604)
- 5.2.3.22. Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Śmiech A. (2015) *Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application*. Vet. Res. Commun. 39: 7-17. (MNiSW₂₀₁₅ 25; IF₂₀₁₅ 0,988)
- 5.2.3.23. Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Mikiewicz M., Rotkiewicz T. (2014) *Guzy histiocytarne u psów i kotów*. Weter. Prakt. 5: 89-93. (MNiSW₂₀₁₄ 3; IF₂₀₁₄ 0)

Wyniki powyższych badań zaprezentowano również na konferencji międzynarodowej w postaci doniesienia opublikowanego w czasopiśmie z listy JCR.

5.2.4. Diagnostyka chorób zakaźnych i niezakaźnych zwierząt

Brałam również aktywny udział w badaniach nad chorobami zakaźnymi i niezakaźnymi zwierząt, często w oparciu o diagnozowane przypadki kliniczne. Szczególnie ciekawe były badania dotyczące przypadku uogólnionej kryptokokozy u szesnastomiesięcznego maltańczyka u którego badaniem histopatologicznym zajętych narządów stwierdzono bardzo słabą odpowiedź układu immunologicznego, co sugerowało wrodzony niedobór immunologiczny (5.2.4.1.). Uczestniczyłam również w badaniach nad dirofilariozą skórą u psów, diagnozując oraz analizując 22 przypadki tej choroby pasożytniczej. Larwalne oraz dorosłe osobniki z gatunku *Dirofilaria repens* zostały wykryte badaniem cytologicznym lub histopatologicznym u psów, które prezentowały różnorodne objawy kliniczne np. guzy skórne, wodoosierdzie, wodobrzusze, czy uogólnioną limfadenopatię. W większości przypadków obecność pasożyta była związana z ropnym, ziarniniakowo-ropnym, ziarniniakowym lub eozynofilnym zapaleniem skóry oraz tkanki podskórnej. Ciekawym wynikiem badań była obserwacja przypadkowej obecności osobników dorosłych lub mikrofilarii w obrębie zmian nowotworowych oraz torbieli ślinianki. Po raz pierwszy opisano również występowanie mikrofilarii w płynie osierdziowym oraz otrzewnowym, jak również w reaktywnie powiększonych węzłach chłonnych. Efektem tych badań była praca oryginalna 5.2.4.2. Brałam również udział w badaniach nad przypadkami wirusowej krwotocznej choroby królików

(5.2.4.3.), opornego na leczenie idiopatycznego zapalenia jelit u kota (5.2.4.4.), w analizie metod diagnostycznych zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (5.2.4.5.) oraz przerzutem raka brodawkowatego płuc do tchawicy oraz paliczka dystalnego (tzw. zespół palcowo-płucny) u kota (5.2.4.6.), na podstawie zebranych przypadków klinicznych.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 6 pracach oryginalnych:

- 5.2.4.1. Kwiatkowska M., Pomianowski A., Adamiak Z., **Otrocka-Domagala I.**, Widawski T., Paździor K. (2011) *Atypical sphenoid bone osteomyelitis in a maltanese dog caused by cryptococcosis: a case report*. Vet. Med. Czech. 56: 683-694. (MNiSW₂₀₁₁ 25; IF₂₀₁₁ 0,748)
- 5.2.4.2. Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Myrdek P., Mikiewicz M., Gesek M. (2018) *Dirofilaria repens - An etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs*. Vet. Clin. Pathol. 47: 307-311. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₇ 0.937)
- 5.2.4.3. Paździor K., **Otrocka-Domagala I.**, T. Rotkiewicz, A. Drzewiecka (2011) *Wirusowa krwotoczna choroba królików – nowe aspekty immunologiczne i anatomopatologiczne*. Życie Wet. 86: 865-869. (MNiSW₂₀₁₁ 4; IF₂₀₁₁ 0)
- 5.2.4.4. Nieśpielak P., Paździor-Czapula K., Czerski A., **Otrocka-Domagala I.** (2014) *Nietypowy przypadek opornej na leczenie choroby zapalnej jelit u kota europejskiego*. Życie Wet. 89: 512-516. (MNiSW₂₀₁₄ 4; IF₂₀₁₄ 0)
- 5.2.4.5. Nieśpielak P., Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Czerski A. (2016) *Obecny stan wiedzy na temat zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów. Część II. Diagnostyka, prewencja, leczenie, opis przypadku*. Życie Wet. 91: 571-575. (MNiSW₂₀₁₆ 4; IF₂₀₁₆ 0)
- 5.2.4.6. Galanty M., Kaczmar E., Kowalczyk W., Balcerzak J., Błażeja R., Frymus J., Tomkowicz A., **Otrocka-Domagala I.**, Rychlik A. (2016) *Zastosowanie endoskopii w diagnostyce i leczeniu guza tchawicy u kota*. Życie Wet. 91: 941-943. (MNiSW₂₀₁₆ 4; IF₂₀₁₆ 0)

Wyniki tych badań zaprezentowano również na konferencji krajowej w postaci doniesień posterowych.

Opisałam również bardzo ciekawy przypadek ciężkiej postaci zespołu Ehlersa-Danlosa u psa, z upośledzeniem elastyczności skóry, więzadeł i stawów. Byłam również pierwszym autorem, oraz współautorem doniesień konferencyjnych opisujących przypadki sarkocystozy mięśni u żółwia lądowego oraz postaci trzewnej dny moczanowej u młodego żółwiaka

chińskiego. Wyniki tych badań zaprezentowano na konferencjach międzynarodowych w postaci doniesień opublikowanych w czasopismach z listy JCR.

W sposób szczególny zainteresowałam się diagnostyką cytologiczną zmian nowotworowych i nienowotworowych różnych gatunków zwierząt, którą zajmuję się na co dzień. Efektem moich zainteresowań, badań oraz wieloletniej analizy przypadków cytologicznych była monografia, której jestem pierwszym autorem, współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Funduszu Społecznego „*Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie*”. W pozycji znajduje się wiele ciekawych, udokumentowanych fotograficznie przypadków cytologicznych pochodzących ze zmian skórnych, tkanki podskórnej, układu limfatycznego, jamy nosowej, jamy ustnej, ślinianek, gruczołu mlekowego, układu rozrodczego, tarczycy, kości oraz płynów z jam ciała. Ponieważ monografia została napisana również w języku angielskim, rozesłano ją do różnych, zaprzyjaźnionych ośrodków naukowo-badawczych i laboratoriów na całym świecie min. w USA, Chorwacji, Serbii, Włoch i Wielkiej Brytanii, gdzie cieszy się dużym zainteresowaniem.

5.2.4.7. **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K., Gesek M., Rotkiewicz T. (2014) *Atlas cytodiagnostyki zwierząt*. Wydawnictwo BUK, Białystok, Polska, Wydawca UWM w Olsztynie, 161 stron (ISBN 978-83-62668-91-5).

Byłam również współautorem pracy będącej efektem między innymi mojego wieloletniego doświadczenia w diagnostyce preparatów cytologicznych i histopatologicznych, oraz obserwacji częstych błędów popełnianych przez lekarzy praktyków w pobieraniu i przesyłaniu próbek do badań, które negatywnie wpływają na jakość diagnostyczną preparatów. Praca miała na celu zwrócenie uwagi lekarzy na konieczność zachowania ustalonych procedur w postępowaniu z materiałem tkankowym oraz roli jaką pełni w procesie diagnostycznym prawidłowo i skrupulatnie wypełnione skierowanie. Brałam również aktywny udział w analizie biopsji endometrium oraz badania histopatologicznego jako skutecznej metody wykrywania przyczyn niepłodności u kłaczy. Praca ta z powodu aspektów klinicznych i zaobserwowanego wzrostu przypadków zaburzeń rozrodu u kłaczy, ma szczególne znaczenie.

Wyniki powyższych badań i analiz zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych:

5.2.4.8. Paździor K., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Rotkiewicz T. (2013) *Badanie cytologiczne i histopatologiczne – zasady prawidłowego pobierania, opisywania i przesyłania materiału do badań*. Weter. Prakt. 10: 77-83. (MNiSW₂₀₁₃ 3; IF₂₀₁₃ 0)

5.2.4.9. Paździor-Czapula K., **Otrocka-Domagala I.**, Gesek M., Mikiewicz M., Rapacz-Leonard A. (2016) *Biopsja i ocena histopatologiczna endometrium w diagnostyce niepłodności u klaczy*. *Życie Wet.* 91: 435-439. (MNiSW₂₀₁₆ 4; IF₂₀₁₆ 0)

5.2.5. Badania nad poszukiwaniem i testowaniem nowych celów terapeutycznych w leczeniu astmy alergicznej z wykorzystaniem modelu mysiego

Uczestniczyłam również w badaniach nad poszukiwaniem i testowaniem nowych celów terapeutycznych w leczeniu astmy alergicznej (badania z zastosowaniem mysiego modelu astmy alergicznej). Należy zaznaczyć, że stale poszukuje się nowych leków do terapii astmy, a szczególnie jej postaci opornych na leczenie glikokortykosteroidami. Jednymi z kandydatów na tego typu leki mogą być substancje hamujące aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB), takie jak IMD-0354 oraz aktywujące receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów typu gamma (PPARs-γ), jak np. rozyglitazon. Dlatego też podjęto wstępne badania nad tymi efektywnością tych celów terapeutycznych w leczeniu astmy uwzględniając ocenę ich oddziaływanie na immunopatogenezę choroby. W tym celu oceniano wpływ IMD-0354 (tj. inhibitora kinazy inhibitora NF-κB) i rozyglitazonu (tj. selektywnego agonisty PPAR-γ) na rozwój i natężenie modelu astmy alergicznej i na odpowiedź immunologiczną ze strony efektorowych i regulatorowych limfocytów T CD4⁺ w węzłach chłonnych śródpiersiowych i płucach - a więc odpowiednio w strefach indukcyjnej i efektorowej odpowiedzi immunologicznej, związanej z patogenezą astmy alergicznej. Przeprowadzone badania wykazały, że hamowanie aktywacji NF-κB za pomocą IMD-0354 zapobiegało rozwojowi astmy alergicznej, a efekt ten było skorelowany z brakiem rekrutacji efektorowych limfocytów T CD4⁺ na teren dolnych dróg oddechowych. Uzyskane wyniki wskazują, że ten ostatni efekt miał charakter wtórny, tj. wynikał z zablokowania klonalnej ekspansji limfocytów T CD4⁺ w węzłach chłonnych śródpiersiowych w odpowiedzi na prowokację alergenem, a nie z hamowania jako takiego rekrutacji tych komórek na teren płuc. Z kolei stosowanie agonisty PPAR-γ (tj. rozyglitazonu), jedynie zmniejszało natężenie choroby i ograniczało odpowiedź immunologiczną, ale jej nie zapobiegało, ani nie znosiło. Wbrew wielu przesłankom, uzyskane wyniki wskazują, że aktywacja PPAR-γ wcale nie wpływa hamująco na sam proces produkcji IL-4, IL-10 i IL-17 (czyli cytokin zaangażowanych w patogenezę astmy) przez limfocyty T CD4⁺, tj. nie wygasza zdolności tych komórek do produkcji w/w cytokin, jakkolwiek zmniejsza powstawanie producentów tych cytokin w węzłach chłonnych śródpiersiowych. Tak więc aktywacja PPAR-γ nie wpływa w sposób bezpośredni na produkcję IL-4, IL-10 i IL-17 limfocyty T CD4⁺, jakkolwiek wszystko wskazuje na to, że w sposób

pośredni hamuje ten proces. Uzyskane wyniki również nie potwierdziły, aby rekrutacja komórek regulatorowych o fenotypie $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+\text{CD4}^+$, bądź ich lokalne generowanie pośredniczyło w anty-astmatycznym działaniu związanym z aktywacją PPAR- γ (lub inaczej: było jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za anty-astmatyczne właściwości agonistów PPAR- γ). Całokształt wyników wskazuje, że aktywacja PPAR- γ nie jest szczególnie obiecującą opcją terapeutyczną w leczeniu astmy.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych:

5.2.5.1. Maślanka T., **Otrocka-Domagala I.**, Zuśka-Prot M., Mikiewicz M., Przybysz J., Jasiecka A., Jaroszewski J.J. (2016) *I κ B kinase β inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4⁺ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes.* Eur. J. Pharmacol. 775: 78-85. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₆ 2,896)

5.2.5.2. Maślanka T., **Otrocka-Domagala I.**, Zuśka-Prot M., Gesek M. (2019) *Beneficial effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, in a mouse allergic asthma model is not associated with the recruitment or generation of Foxp3-expressing CD4⁺ regulatory T cells.* Eur. J. Pharmacol. 848: 30-38. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₇ 3,040)

Wyniki tych badań zaprezentowano także na konferencji międzynarodowej oraz krajowej w postaci doniesień posterowych.

5.2.6. Badania nad wpływem różnych dawek zearalenonu na układ rozrodczy i pokarmowy zwierząt

Ważną częścią mojego dorobku naukowego jest udział w badaniach nad wpływem różnych dawek zearalenonu (ZEN) i jego metabolitów na układ rozrodczy i pokarmowy wybranych gatunków zwierząt, prowadzonych przez Katedrę Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zearalenon, zwany również toksyną F-2, jest trzecią spośród najczęściej spotykanych w tkankach roślin mykotoksyną, syntetyzowaną przez liczne gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*, a jej źródłem mogą być wszystkie produkty pochodzenia roślinnego. ZEN jest silną, niesteroidową substancją o właściwościach estrogennych mającą powinowactwo do receptorów estrogenowych, której działanie jest kilkakrotnie silniejsze od endogennego estrogeny. W związku z tym ZEN i jego metabolity są przyczyną poważnych zaburzeń rozrodu zwierząt. Badania wykazały, że ZEN i jego metabolity niekorzystnie wpływają również na status immunologiczny, głównie przewodu pokarmowego. W związku z szerokim zakresem

działania ZEN oraz powszechnym jego występowaniem w środowisku i pożywieniu, jest on często przyczyną znacznych strat w chowie zwierząt. W badaniach skoncentrowano się głównie na niskich dawkach ZEN i ich wpływie (zależnym od czasu ekspozycji) na funkcjonowanie układu rozrodczego oraz pokarmowego zwierząt, wraz z analizą ich poziomów w surowicy i tkankach zwierząt, jak również oceną patomorfologiczną i immunohistochemiczną zmian obserwowanych w wybranych narządach wewnętrznych. Moja rola w badaniach polegała na analizie mikroskopowej zmian w układzie rozrodczym i układzie pokarmowym z wykorzystaniem metod histopatologicznych i immunohistochemicznych (ocena ekspresji PCNA, 3 β -HSD i 17 β -HSD). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że istnieje zależny od dawki i czasu ekspozycji wpływ ZEN na morfologię i aktywność jajników, błony śluzowej macicy, żołądka, jelit i wątroby. W macicy ZEN powodował zaburzenia w krążeniu, zanik lub przerost gruczołów macicznych, zanik myometrium oraz włóknienie. W grupach badawczych stwierdzono ponadto zależny od dawki oraz dojrzałości płciowej zwierząt wpływ na aktywność mitotyczną komórek endometrium i myometrium. ZEN niekorzystnie wpływał również na funkcjonowanie jajników powodując wzrost liczby pęcherzyków atrezyjnych i obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że wzrost ekspresji enzymów 3 β -HSD i 17 β -HSD biorących udział w biosyntezie między innymi progesteronu i estradiolu, jest odwrotnie proporcjonalny do wielkości użyczonej dawki, tzn. że przy wysokich dawkach ZEN spada ekspresja obu enzymów. Wpływ ZEN na morfologię i funkcjonowanie przewodu pokarmowego był również zależny od dawki i czasu trwania ekspozycji. W żołądku i jelitach obserwowano nacieki zapalne, a ich intensywność była wprost proporcjonalna do wielkości użyczonej dawki. Okazało się, że najbardziej wrażliwa na toksyczny efekt działania jest błona śluzowa dwunastnicy. W wątrobie obserwowano zmiany wsteczne hepatocytów o różnego stopnia nasileniu, którym towarzyszyły śródmiąższowe nacieki zapalne. Wyniki przeprowadzonych badań są unikatowe i w znaczący sposób poszerzają wiedzę na temat szerokiego, toksycznego wpływu mykotoksyn na organizm zwierząt i tym samym człowieka.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 6 pracach oryginalnych:

- 5.2.6.1. Obremski K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Mikołajczyk A., Gajęcka M., Polak M. (2003) *Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts*. Pol. J. Vet. Sci. 6: 239-245. (MNiSW₂₀₀₃ 6; IF₂₀₀₃ 0)
- 5.2.6.2. Gajęcka M., Jakimiuk E., Polak M., **Otrocka-Domagala I.**, Janowski T., Zwierzchowski W., Obremski K., Zielonka Ł., Apoznański J., Gajęcki M. (2004)

Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. Pol. J. Vet. Sci. 7: 59-66. (MNiSW₂₀₀₄ 6; IF₂₀₀₄ 0)

5.2.6.3. Obremski K., Gajęcki M., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Zwierzchowski W., Zielonka Ł., Mikołajczyk A., Siemionek J. (2005) *Clinical case of rabbit zearalenone mycotoxicosis. Med. Weter. 61: 458-461. (MNiSW₂₀₀₅ 15; IF 0,259)*

5.2.6.4. Zielonka Ł., Polak M., **Otrocka-Domagala I.**, Gajęcka M., Obremski K., Łuczyński M.K., Góra M., Rotkiewicz T., Gajęcki M. (2007) *Impact of zearalenone and zearalenone destructor on the morphology of digestive system in pigs. Med. Weter. 63: 590-594. (MNiSW₂₀₀₇ 10; IF₂₀₀₇ 0)*

5.2.6.5. Gajęcka M., Janowski T., Jakimiuk E., Polak M., Podhalicz- Dzięgielewska M., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.** Obremski K., Zielonka Ł., Gajęcki M. (2007) *Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenon micotoxicosis. Pol. J. Vet. Sci. 10: 143-151. (MNiSW₂₀₀₇ 10; IF₂₀₀₇ 0)*

5.2.6.6. Gajęcka M., **Otrocka-Domagala I.** (2013) *Immunocytochemical expression of 3Beta- and 17 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bitch ovaries exposed to low doses of zearalenone. Pol. J. Vet. Sci. 16: 55-62. (MNiSW₂₀₁₃ 20; IF₂₀₁₃ 0,712)*

5.2.7. Ocena skuteczności działania wybranych opatrunków hemostatycznych

Wzięłam również udział w badaniach prowadzonych przez Katedrę Chirurgii i Rentgenologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, finansowanych z projektu NCBiR (Zestaw opatrunkowy zabezpieczający urazy powstałe w trakcie pełnienia obowiązków służbowych przez służby mundurowe DOB-BIO 6/19/98/2014), których celem była ocena skuteczności działania i bezpieczeństwa długotrwałego stosowania opatrunków QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO i Celox Gauze z wykorzystaniem modelu świni. Zastosowanie środka hemostatycznego jest jedną z najprostszych i najskuteczniejszych metod leczenia rozległego krwawienia i zapobiegania jego powikłaniom i śmierci. Krótkotrwałe stosowanie opatrunków nowej generacji jest bezpieczne i nie powoduje poważnych skutków ubocznych, jednak ich długotrwałe stosowanie, powyżej kilkunastu godzin, może nieść za sobą ryzyko wystąpienia koagulopatii i rozwoju postępującego stadium wstrząsu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że długotrwałe stosowanie ocenianych opatrunków hemostatycznych wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia koagulopatii i rozwinięciem nieodwracalnej fazy wstrząsu, a w miejscu ich aplikacji dochodzi do martwicy i stanu zapalnego mięśni. Resztki opatrunków

hemostatycznych mogą wnikać do krążenia ogólnoustrojowego, powodując tym samym ryzyko powstania zatorów naczyniowych. Z powodu tych szkodliwych efektów działania oceniane opatrunki hemostatyczne nie są odpowiednie do długotrwałego stosowania. Konieczne są przyszłe badania poszerzające wiedzę na temat skutków długotrwałego stosowania środków hemostatycznych. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań spotkały się z bardzo dużym zainteresowaniem na całym świecie, szczególnie wśród producentów różnych opatrunków hemostatycznych.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych:

5.2.7.1. Adamiak Z., Pomianowski A., Jastrzębski P., **Otrocka-Domagala I.**, Holak P., Zhalniarovich Y., Przyborowska P., Głodek J. (2014) *Effect of 24 hour application of three hemostatic dressings to porcine thigh muscles*. Pol. J. Vet. Sci. 17: 519-521. (MNiSW₂₀₁₄ 20; IF₂₀₁₄ 0,604)

5.2.7.2. **Otrocka-Domagala I.**, Jastrzębski P., Adamiak Z., Paździor-Czapula K, Gesek M., Mikiewicz M., Rotkiewicz T. (2016) *Safety of the long-term application of QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO and Celox Gauze in a femoral artery injury model in swine - the preliminary study*. Pol. J. Vet. Sci. 19: 337-343. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₆ 0,697)

5.2.8. Wpływ różnych warunków chowu oraz patogenów na obraz histopatologiczny, histochemiczny i wybrane parametry morfometryczne narządów wewnętrznych ptaków hodowlanych

Badania przeprowadzono w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, a ich głównym pomysłodawcą był dr wet. Michał Gesek. Zakres przeprowadzonych badań jest bardzo szeroki i porusza różne aspekty i problemy hodowli drobiu i przepiórek. Wyniki badań przeprowadzonych na brojlerach kurzych wykazały obecność dysplazji włóknisto-mięśniowej (FMD), czyli niemiażdżycowej, niezapalanej choroby naczyń krwionośnych. FMD wykryto w naczyniach krwionośnych nerek, wątroby i płuc ptaków poddanych intensywnej hodowli. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne ujawniły występowanie dwóch podtypów FMD. Etiologia FMD jest wciąż nieznaną, jednak bierze się przede wszystkim pod uwagę czynniki genetyczne. Celem kolejnych badań była analiza zmian mikroskopowych i ultrastrukturalnych wątroby kurcząt brojlerów trzech linii genetycznych (Ross 308, Cobb 500, Hubbard F15) w wybranych dniach tuczu. Wyniki badań histopatologicznych wykazały obecność zmian zwyrodnieniowych hepatocytów z martwicą włącznie, proliferacji przewodów

i przewodników żółciowych z towarzyszącym naciekiem komórek limfoidalnych oraz reaktywne pobudzenie grudek limfatycznych. Ocena ultrastrukturalna ujawniła nieprawidłowości związane z mitochondriami i szorstkim retikulum endoplazmatycznym hepatocytów oraz gromadzenie śródcytoplazmatycznych kropli lipidowych. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wysunięto niosek, że nasilenie zmian mikroskopowych i ultrastrukturalnych postępuje wraz z długością chowu i ma najprawdopodobniej związek z jego intensywnością. Celem innych badań była ocena zmian patomorfologicznych wybranych odcinków jelit przepiórek japońskich naturalnie zakażonych *Eimeria tsunodai* oraz poddanych terapii różnymi dawkami kokcydiostatyku toltrazurylu (Baycox 2.5%) wraz z monitorowaniem efektów leczenia. Na podstawie analizy morfometrycznej i morfologicznej dokonano identyfikacji gatunku kokcydiów. Wykazano, że głównym miejscem bytowania patogenu jest jelito ślepe, w którym obserwowano najwięcej zmian patomorfologicznych. Stopień uszkodzenia błony śluzowej jelita ślepego wzrastał wraz z wiekiem, a największe uszkodzenie stwierdzono w wieku 48 tygodni. Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto wniosek, że infekcje *Eimeria tsunodai* występują u przepiórek japońskich podczas całego okresu nieśności, a różne stadia rozwojowe kokcydiów są odpowiedzialne za całkowite uszkodzenie błony śluzowej jelita ślepego. Wyniki badań nad skutecznością terapeutyczną różnych dawek toltrazurylu wykazały, że żadna z nich nie spowodowała całkowitego unieszkodliwienia pasożytów. Ponadto, okazało się, że suplementacja toltrazurylem powoduje toksyczne zmiany patologiczne w wątrobie i nerkach ptaków. Tematem kolejnych badań była ocena wpływu kapłonizacji (kastracji) na obraz patomorfologiczny narządów wewnętrznych oraz stan układu immunologicznego kogutów rasy Leghorn w różnych okresach chowu. Wyniki badań wykazały, że zabieg kapłonizacji, z następowym obniżeniem poziomu androgenów powoduje gromadzenie tkanki tłuszczowej w różnych narządach wewnętrznych, mięśniach, tkance podskórnej i jamie brzusznej, a nasilenie zmian postępuje wraz z długością tuczu. Kapłonizacja ma również wpływ na funkcjonowanie układu limfatycznego, czego efektem były obserwowane nacieki komórek limfoidalnych w badanych narządach i tkankach.

Wyniki powyższych przeprowadzonych badań są unikatowe, ponieważ w dostępnej literaturze bardzo mało jest doniesień naukowych opisujących i analizujących zmiany morfologiczne narządów ptaków hodowlanych w różnych warunkach chowu. Wiedza na ten temat jest bardzo ważna, ze względu na dobrostan zwierząt oraz jakość otrzymanych produktów żywnościowych.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 7 pracach oryginalnych:

- 5.2.8.2. Gesek M., Paździor K., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz T., Szarek J. (2013) *Fibromuscular dysplasia in arteries and in a vein in broiler chickens*. Pol. J. Vet. Sci. 16: 93-99. (MNiSW₂₀₁₃ 20; IF₂₀₁₃ 0,712)
- 5.2.8.3. Gesek M., Szarek J., **Otrocka-Domagala I.**, Babinska I., Paździor K., Szweda M., Andrzejewska A., Szynaka B. (2013) *Morphological pattern of the livers of different lines of broiler chickens during rearing*. Vet. Med. Czech. 58: 16-24. (MNiSW₂₀₁₃ 25; IF₂₀₁₃ 0,756)
- 5.2.8.4. Gesek M., Welenc J., Tylicka Z., **Otrocka-Domagala I.**, Paździor K., Rotkiewicz A. (2014) *Pathomorphological changes in the alimentary system of Japanese quails naturally infected with Eimeria tsunodai*. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2014, 58: 41-45. (MNiSW₂₀₁₄ 15; IF₂₀₁₄ 0,357)
- 5.2.8.5. Gesek M., **Otrocka-Domagala I.**, Sokół R., Paździor-Czapula K., Lambert BD., Wiśniewska A.M., Żechowicz M., Mikiewicz M., Korzeniowska P. (2016) *Histopathological studies of the heart in three lines of broiler chickens*. Br. Poult. Sci. 57: 219-226. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₆ 0,884)
- 5.2.8.6. Gesek M., Sokół R., Lambert BD., **Otrocka-Domagala I.** (2018) *Effect of Effective Microorganisms on intestinal morphology and morphometry in Japanese quails*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 42: 285-291. (MNiSW₂₀₁₆ 15; IF₂₀₁₇ 0.489)
- 5.2.8.7. Gesek M., Murawska D., **Otrocka-Domagala I.**, Michalska K., Zawacka M. (2018) *Effects of caponization and age on the histology, lipid localization, and fiber diameter in muscles from Leghorn cockerels*. Poult. Sci. 98: 1354-1362. (MNiSW₂₀₁₆ 35; IF₂₀₁₇ 2.216)
- 5.2.8.8. Gesek M., Murawska D., **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K., Michalska K. (2018) *Effects of caponization and age on the histology of the internal organs of Leghorn cockerels*. Br. Poult. Sci. 2018 Dec 30. doi: 10.1080/00071668.2018.1564243. (MNiSW₂₀₁₆ 30; IF₂₀₁₇ 1,096)

Wyniki powyższych badań opublikowano również w 1 pracy oryginalnej w czasopiśmie z poza listy JCR:

- 5.2.8.9. Gesek M., Sokół R., Welenc J., Tylicka Z., Korzeniowska P., Kozłowska A., Wiśniewska AM, **Otrocka-Domagala I.** (2015) *Histopathological observations of the internal organs during Toltrazuril (Baycox®) treatment against naturally occurring coccidiosis in Japanese Quail*. Pak. Vet. J. 35: 479-483. (MNiSW₂₀₁₅ 0; IF₂₀₁₅ 0,822)

Wyniki badań zaprezentowano także na konferencji międzynarodowej w postaci doniesienia opublikowanego w czasopiśmie z listy JCR.

5.2.9. Immunopatologia zakażeń pasożytniczych i metod terapeutycznych u ludzi i zwierząt

Podczas mojego stażu naukowego w 2013 roku w Zakładzie Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Produkcji Zwierząt, Uniwersytetu Federico II w Neapolu we Włoszech, którego tematem wiodącym były metody diagnostyki patomorfologicznej chorób mięśni zwierząt, rozpoczęłam współpracę z Profesorem Orlando Paciello. Profesor Paciello jest znanym w Europie ekspertem w dziedzinie diagnostyki schorzeń mięśni u zwierząt. Efektem tej współpracy jest mój udział w międzynarodowym projekcie pod tytułem : *“Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies”* („*Patogeneza, klasyfikacja i leczenie miopatii zapalnych*”). Pozostali współtwórcy: Orlando Paciello (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Serenella Papparella (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Laura Rinaldi (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Sławomir Wójcik (Uniwersytet Medyczny w Gdańsku, Polska), Luisa Politano (Uniwersytet Luigiego Vanvitelli’ego w Kampanii, Włochy), Valentina Iovane (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu), Luigi Gradoni (Narodowy Instytut Zdrowia, Włochy), Gaetano Oliva (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu). Celem projektu są badania and miopatiami zapalnymi u różnych gatunków zwierząt, wraz z poszukiwaniem ich przyczyn oraz ustaleniem protokołów terapeutycznych.

Efektem mojej współpracy z Profesorem Paciello było również przygotowanie specjalnego wydania „*Parasitology*” czasopisma naukowego (z listy JCR) BioMed Research International. Razem z Orlando Paciello, Chiarą Palmieri, Laurą Rinaldi, Jorgem Morales-Montor i Peterem Geldhof byłam współredaktorem tego wydania. W wydaniu tym opublikowane zostały również 2 prace, których jestem współautorem. Jedna z nich to praca przeglądowa, w której zwrócono uwagę na mechanizmy odpornościowe zaangażowane w patogenezę infekcji pasożytniczych u ludzi i zwierząt oraz wpływu defektów immunologicznych spowodowanych chorobami autoimmunologicznymi, niedoborami immunologicznymi i reakcjami nadwrażliwości, na przebieg parazytozy i efektywność zastosowanej terapii (5.2.9.1.). Zapalenie mięśnia sercowego związane z chorobami zakaźnymi może występować u psów w przebiegu infekcji pierwotniakami *Neospora caninum*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis*, czy *Hepatozoon canis*. Chorobę serca udokumentowano również w leishmaniozie (*Leishmania infantum*), ale jak to tej pory nie ma badań na temat immunopatologicznych cech zapalenia mięśnia sercowego w przebiegu tej choroby. Celem podjętych badań była zatem analiza immunofenotypu komórek biorących udział w nacieku zapalnym mięśnia sercowego, wraz z oceną ekspresji antygenów powierzchniowych MHC

klasy I i II u psów z rozpoznaną przyżyciowo trzewną postacią leiszmaniozy. W mięśniu sercowym chorych zwierząt obserwowano włóknienie, szkliwienie i martwicę kardiomiocytów oraz nacieki jednojądrzastych komórek zapalnych, głównie limfocytów i makrofagów. Wyniki badań immunohistochemicznych wykazały, że dominującą populacją wśród komórek zapalnych były limfocyty CD8⁺, natomiast limfocyty CD4⁺ stanowiły mniejszy odsetek. Wiele kardiomiocytów wykazywało błonową ekspresję MHC klasy I i II. Formy amastigoty pasożyta nie wykryto w makrofagach ani w innych komórkach w badanych próbkach mięśni. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na dokonanie wstępnej charakterystyki immunofenotypu naciekających komórek jednojądrzastych i ekspresji antygenów MHC klasy I i II w zapaleniu mięśnia sercowego związanym z zakażeniem *L. infantum* u psów. Nasze badania dostarczyły dowodów, że w przebiegu leiszmaniozy może wystąpić zapalenie mięśnia sercowego związane z infekcją *L. infantum*. Jeśli nasze wyniki zostaną potwierdzone przez szersze badania wykonane na większej liczbie zwierząt, w sposób istotny przyczynią się do ulepszenia protokołów terapeutycznych psów dotkniętych leiszmaniozą, a nawet mogą przyczynić się do poszukiwania nowych leków modulujących odpowiedź immunologiczną w kierunku zmniejszenia zapalenia mięśnia sercowego w przebiegu tej parazytozy.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 1 pracy przeglądowej (5.2.9.1) oraz 1 pracy oryginalnej (5.2.9.2.):

5.2.9.1 Paciello O., Palmieri C., **Otrocka-Domagala I.**, Rinaldi L., Morales-Montor J, Geldhof P. (2016) *Immunopathology of parasitic infections and therapeutic approaches in humans and animals*. Biomed Res. Int. 2016: 8213532. (MNiSW₂₀₁₆ 25; IF₂₀₁₆ 2,476)

5.2.9.2. Costagliola A., Piegari G., **Otrocka-Domagala I.**, Ciccarelli D., Iovane V., Oliva G., Russo V., Rinaldi L., Papparella S., Paciello O. (2016) *Immunopathological Features of Canine Myocarditis Associated with Leishmania infantum Infection*. Biomed Res. Int. 2016: 8016186. (MNiSW₂₀₁₆ 25; IF₂₀₁₆ 2,476)

5.2.10. Badania nad encefalopatią nerek oraz wpływem melatoniny na stan skóry, okrywy włosowej oraz obraz morfologiczny narządów wewnętrznych nerek.

Brałam również udział w badaniach różnych stanów chorobowych u nerek. Pierwsze badania dotyczyły ustalenia przyczyny encefalopatii wątrobowej w stadzie nerek hodowlanych, których 40% diety stanowiły surowe ryby. Kilkaset zwierząt zachorowało dość nagle z objawami braku apetytu i pragnienia, napadami padaczkowymi, paraliżem kończyn tylnych, łzawieniem, światłowstrętem, zapaleniem spojówek i wielomoczem. W ciągu 2-5 dni od

wystąpienia objawów nastąpiły masowe upadki zwierząt. Badania mikrobiologiczne wykluczyły czynniki infekcyjne i zatrucie pokarmowe. Wyniki badań histopatologicznych ujawniły zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych mózgu, dystrofię wątroby i nerek, martwicę kosmków jelitowych oraz zanik grudek śledzionowych. Na podstawie przeprowadzanych badań ustalono, że przyczyną upadków była encefalopatia wątrobowa związana ze skarmianiem zwierząt surowymi rybami bogatymi w enzym zwany tiaminazą, który jest czynnikiem dezaktywującym witaminę B1 w paszy. Świeża dieta wzbogacona o wysoki poziom witaminy B1 spowodowała powrót do zdrowia nerek w ciągu 3-5 dni. Celem innych badań było określenie wpływu melatoniny (6 mg Melakryl) zaaplikowanej pod postacią podskórnego implantu na ogólny stan zdrowia skóry, jakość sierści oraz obraz patomorfologiczny wybranych narządów wewnętrznych. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że trzymiesięczne stosowanie melatoniny było przyczyną zwiększenia przyrostów wagowych, skrócenia okresu dojrzewania zimowej okrywy włosowej, negatywnie jednak wpłynęło na jakość okrywy włosowej. Wyniki badań laboratoryjnych i histopatologicznych potwierdziły korzystny wpływ melatoniny na enzymy wątrobowe, poziom mocznika i kreatyniny, a także na morfologię mózgu, wątroby, nerek, płuc i śledziony.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 3 pracach oryginalnych:

- 5.2.10.1. Kopczewski A., Rotkiewicz T., Sroka A., **Otrocka-Domagala I.**, Bis-Wencel H. (2005) *Case of hepatic encephalopathy in minks*. Med. Weter. 61: 345-348. (MNiSW₂₀₀₅ 15; IF₂₀₀₅ 0,259)
- 5.2.10.2. Kopczewski A., Sroka A., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Zoń A. (2007) *Effect of melatonin implants on the morphological picture of selected internal organs and hematological and biochemical indices in minks*. Pol. J. Vet. Sci. 10: 75-81. (MNiSW₂₀₀₇ 10; IF₂₀₀₇ 0,291)
- 5.2.10.3. Sroka A., Rotkiewicz T., Kopczewski A., **Otrocka-Domagala I.** (2007) *Effect of melatonin treatment on the general state of health and fur quality of minks*. Med. Weter. 63: 581-585. (MNiSW₂₀₀₇ 10; IF₂₀₀₇ 0)

5.2.11. Pozostałe prace oryginalne

Brałam również udział w badaniach poświęconych aktywności proliferacyjnej różnych populacji komórek łożysk krów w różnych okresach ciąży (5.2.11.1.), w badaniach nad wpływem czynników żywieniowych oraz bakterii probiotycznych na morfologię przewodu pokarmowego oraz narządów wewnętrznych prosiąt (5.2.11.2., 5.2.11.3., 5.2.11.4., 5.2.11.5.,

5.2.11.6.). Uczestniczyłam także w badaniach nad wpływem infekcji *Yersinia enterocolitica* na przebieg ciąży macior (5.2.11.7.), oraz w badaniach nad użyciem klipsów NiTi w zespoleniach jelit cienkich u prosiąt (5.2.11.8.). Jednym z tematów pobocznych moich badań nad wpływem SIM na przebieg procesu regeneracji mięśni szkieletowych było wykonanie analizy jej wpływu na prekursorzy czerwonych krwinek szpiku kostnego, a efektem tych badań była publikacja 5.2.11.9. W ostatnim czasie brałam również udział w ciekawych badaniach nad biokompatybilnością implantu kostnego stworzonego na bazie chitozanu, kolagenu i kwasu hialuronowego uzupełnionego hydroksyapatytem i kwasem taninowym. Wyniki badań wykazały bardzo dobrą odpowiedź regeneracyjną tkanek na obecność implantu (5.2.11.10.). Uczestniczyłam również w badaniach z zakresu immunofarmakologii. Wykazano w nich, że prostaglandyna E2 (PGE2), a więc substancja będąca zarówno fizjologicznym autakoidem, jak i mediatorem prozapalnym, 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 oraz (b) występowanie i natężenie proapoptotycznego działania PGE2 jest zależne od jej stężenia. Uzyskane wyniki sugerują, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (a więc leków wywierających działanie poprzez hamowanie syntezy PGE2) u zwierząt z zakażeniami wirusowymi może chronić komórki NK przed indukowanymi przez PGE2 apoptozą oraz upośledzeniem proliferacji. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w pracy 5.2.11.11.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 11 pracach oryginalnych:

- 5.2.11.1. Podhalicz-Dzięgielewska M., **Otrocka-Domagala I.**, Zduńczyk S., Janowski T., Rotkiewicz T., Mikołajczyk A. (2003) *Proliferative activity of the cells of placentomes in different periods of gestation. Med. Weter.* 59: 997-999. (MNiSW₂₀₀₃ 10; IF₂₀₀₃ 0,236)
- 5.2.11.2. Stanek M., Purwin C., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Kasperowicz B. (2004) *Nutrient digestibility, nitrogen balance and histopathological changes in the internal organs of fattening pigs fed diets containing yellow lupin seeds and feed enzymes. Ann. Anim Sci.* 2: 199-203. (MNiSW₂₀₀₄ 6; IF₂₀₀₄ 0)
- 5.2.11.3. Babińska I., Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.** (2005) *The effect of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. administration on the morphology of the*

- gastrointestinal tract, liver and pancreas in piglets*. Pol. J. Vet. Sci. 8: 29-35. (MNiSW₂₀₀₅ 6; IF₂₀₀₅ 0)
- 5.2.11.4. Rotkiewicz T., Stanek M., Wiśniewska M., **Otrocka-Domagala I.**, Bogusz J., Purwin C., Bomba G. (2007) *Pathomorphological and histochemical examination of the digestive tracts and some internal organs of pigs fed diets containing narrow-leaved lupin (Lupinus Angustifolius) seeds*. Ann. Anim. Sci. 1: 83-88. (MNiSW₂₀₀₇ 4; IF₂₀₀₇ 0)
- 5.2.11.5. Strusińska D., Minakowski D., Bomba G., **Otrocka-Domagala I.**, Wiśniewska M., Tywończuk J. (2009) *Effect of whole cereal grains contained in the ration on calf performance and selected morphometric parameters of the rumen and small intestine*. Czech J. Anim. Sci. 54: 540-551. (MNiSW₂₀₀₉ 15; IF₂₀₀₉ 1,008)
- 5.2.11.6. Stanek M., Rotkiewicz T., Sobotka W., Bogusz J., **Otrocka-Domagala I.**, Rotkiewicz A. (2015) *The effect of alkaloids present in blue lupine (Lupinus angustifolius) seeds on the growth rate, selected biochemical blood indicators and histopathological changes in the liver of rats*. Acta Vet. Brno 84: 55-62. (MNiSW₂₀₁₅ 20; IF₂₀₁₅ 0,422)
- 5.2.11.7. Platt-Samoraj A., Szweda W., Procajło Z., Wiśniewska M., **Otrocka-Domagala I.** (2010) *The influence of experimental Yersinia enterocolitica infection on the pregnancy course in sows – preliminary studies. III Histopathological lesions*. Pol. J. Vet. Sci. 13: 129-135. (MNiSW₂₀₁₀ 20; IF₂₀₁₀ 0,507)
- 5.2.11.8. Holak P., Jałyński M., Adamiak Z., **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K. (2014) *The use of shape memory NiTi alloy clips small bowel anastomosis in pigs*. Vet. Med. Czech. 59: 124-128. (MNiSW₂₀₁₄ 20; IF₂₀₁₄ 0,639)
- 5.2.11.9. Snarska A., Gonkowski S., Rytel L., Pomianowski A., Babińska I., **Otrocka-Domagala I.**, Żarczyńska K., Wysocka D., Sobiech P. (2017). *Influence of simvastatin on red blood cell line in porcine bone marrow*. Pol J Vet Sci. 20: 811-814. (MNiSW₂₀₁₆ 20; IF₂₀₁₇ 0,839)
- 5.2.11.10. Kaczmarek B., Sionkowska A., **Otrocka-Domagala I.**, Polkowska I. (2018) *In vivo studies of novel scaffolds with tannic acid addition*. Polym. Degrad. Stab. 158: 26-30. (MNiSW₂₀₁₈ 35; IF₂₀₁₈ 3.193)
- 5.2.11.11. Maślanka T., Chrostowska M., **Otrocka-Domagala I.**, Snarska A., Mikiewicz M., Zuśka-Prot M., Jasięcka 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. (MNiSW₂₀₁₆ 35; IF₂₀₁₆ 1,298)

Wyniki powyższych badań zaprezentowano także na konferencji międzynarodowej i konferencjach krajowych.

6. Udział w konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych

W moim dorobku znajdują się 28 doniesienia konferencyjne, z czego w 9 jestem pierwszym autorem. Doniesienia te były prezentowane na 15 konferencjach krajowych i międzynarodowych. Szczegółowe dane na ich temat znajdują się w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. W 10 konferencjach uczestniczyłam czynnie (obecność na konferencji wraz z prezentacją wyników w formie plakatowej lub wystąpienia ustnego); należą tutaj:

- ❖ The Joint European Congress of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists ECVP, Cluj-Napoka, Rumunia, 05-08.09.2018.
- ❖ The 3rd Joint European Congress of the European Society of Veterinary Pathology, European Society of Toxicologic Pathology and European College of Veterinary Pathologists, 35th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 15th Meeting of the European Society of Toxicologic Pathology ESTP, 28th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, Lyon, Francja, 30.08-2.09.2017.
- ❖ The 34th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and 27th Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, Bolonia, Włochy, 07-09.09.2016.
- ❖ Konferencja Międzynarodowa "*Current approaches to health and diseases in animals and humans*", Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, 19-20.09.2014.
- ❖ The 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists, Londyn, Wielka Brytania, 04-07.09.2013.
- ❖ XIV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych "*Nauka praktyce*", Wrocław, 13-15.09.2012.
- ❖ XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów. Temat Zjazdu: „*Czynniki prognostyczne i predykcyjne w patomorfologii*”. Międzyzdroje, 04-07.09.2011,
- ❖ The 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists, Belgrad, Serbia, 08-11.09.2010
- ❖ The 27th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists, Kraków, Polska, 09-12.09.2009.
- ❖ XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 21-23.09.2000.

7. Inna aktywność naukowa

7.1. Monografie

Wykorzystując swoją wiedzę z zakresu patomorfologii zwierząt uczestniczyłam w roli współautora w powstawaniu 2 monografii:

- Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Wiśniewska M., Bomba G., Mikołajczyk A., Kasperowicz B. (2004) „*Patomorfologia komórek i tkanek zwierząt: Świat chorych komórek i tkanek*”, pod redakcją Tadeusza Rotkiewicza. Wydanie 5 zm. i poszerz. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, str. 3-200, (ISBN 83-7299-352-1) – *język polski*
- Rotkiewicz T., **Otrocka-Domagala I.**, Wiśniewska M., Bomba G. (2010) „*Patomorfologia komórek i tkanek zwierząt: Świat chorych komórek i tkanek*”, pod redakcją Tadeusza Rotkiewicza. Wydanie 6 zm. i poszerz. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, str. 4-194, (ISBN 978-83-7299-685-5) – *język polski*

W oparciu o moje wieloletnie doświadczenie w diagnostyce preparatów cytologicznych tkanek zwierząt powstała monografia, której jestem pierwszym autorem, współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Funduszu Społecznego „*Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie*”:

- **Otrocka-Domagala I.**, Paździor-Czapula K., Gesek M., Rotkiewicz T. (2014) „*Atlas cytodiagnostyki zwierząt*”, Wydawnictwo BUK, Białystok, Polska, Wydawca UWM w Olsztynie, 161 stron (ISBN 978-83-62668-91-5) – *język polski i angielski*.

7.2. Recenzje

Byłam recenzentem pracy doktorskiej dott. Alessandro Costagliola pt. „*New prospective on sentinel animal systems: Experiences in southern polluted areas*” (promotor prof. Orlando Paciello), przewód doktorski był prowadzony przez Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytetu Federico II w Neapolu we Włoszech – data obrony pracy doktorskiej 27.05.2017.

Byłam również recenzentem publikacji dla czasopism naukowych z listy JCR:

- Polish Journal of Veterinary Sciences, 22 recenzje w latach 2012 – 2017 (**IF₂₀₁₂ 0,570; IF₂₀₁₃ 0,712; IF₂₀₁₄ 0,604; IF₂₀₁₅ 0,719; IF₂₀₁₆ 0,697; IF₂₀₁₇ 0,839**)
- BioMed Research International, 1 recenzja w roku 2015 (**IF₂₀₁₅ 2,134**)
- Scientific Reports, 1 recenzja w roku 2016 (**IF₂₀₁₆ 4,259**)

- Folia Histochemica et Cytobiologica, 2 recenzje w latach 2017-2018 (IF₂₀₁₇ 1,586)

W okresie od 01.09.2015 do 27.05.2016 byłam redaktorem specjalnego wydania pt. „Parasitology” czasopisma naukowego z listy JCR, tj. BioMed Research International, a od dnia 04.01.2018 jestem redaktorem czasopisma spoza listy JCR, tj. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University.

Jestem również promotorem pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim lek. wet. Mateusza Mikiewicza pt. „Wpływ deksametazonu i simwastatyny na proliferację i apoptozę komórek wątrobowych u prosiąt ”- data otwarcia przewodu doktorskiego 03.07.2014.

7.3. Udział w projektach badawczych

1. Grant KBN Nr 3P 06Z 019 „Cechy tuczne i rzeźne, wartość dietetyczna mięsa, wskaźniki przemian lipidowych i zmiany anatomo-patologiczne jelit u świń wysokomięsnych otrzymujących w drugim okresie tuczu mieszanki o podwyższonej zawartości włókna surowego” Okres realizacji 2003-2006 - udział w charakterze wykonawcy.
2. Projekt badawczy ESR KNOW2018/ESR5/9 ” Identyfikacja mechanizmów indukcji immunosupresji zależnej od komórek NK w trakcie progresji raka sutka u suk.” Okres finansowania 12 miesięcy, data przyznania 31.08.2018 - udział w charakterze wykonawcy
3. Jestem również współtwórcą, będącego obecnie w opracowaniu, międzynarodowego projektu badawczego pod tytułem: “Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies” („Patogeneza, klasyfikacja i leczenie miopatii zapalnych”). Pozostali współtwórcy: Orlando Paciello (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Serenella Papparella (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Laura Rinaldi (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu, Włochy), Sławomir Wójcik (Uniwersytet Medyczny w Gdańsku, Polska), Luisa Politano (Uniwersytet Luigiego Vanvitelli’ego w Kampanii, Włochy), Valentina Iovane (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu), Luigi Gradoni (Narodowy Instytut Zdrowia, Włochy), Gaetano Oliva (Uniwersytet Fryderyka II w Neapolu). Będziemy ubiegać się o dofinansowanie projektu z funduszy Unii Europejskiej. Moja rola w projekcie będzie polegała na opracowaniu przypadków miopatii u zwierząt wraz z pełną analizą histopatologiczną i histochemiczną, opracowaniu wyników wszystkich badań i współudział w przygotowaniu publikacji naukowych.

Wielokrotnie również aplikowałam do Narodowego Centrum Nauki (konkurs OPUS) o finansowanie projektu badawczego.

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

8.1. 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) <i>(w tym stanowiących osiągnięcie naukowe)</i>	55 (3)	1139 (85)	46,225 (5,26)
Prace oryginalne w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	14	50	-
Prace oryginalne w czasopismach spoza list „A” i „B”	1	-	0,822
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW)	4	61	3,326
Prace przeglądowe w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	1	3	-
Monografie	3	30	-
Łącznie	78	1283	50,373

- Punktację MNiSW podano według komunikatu MNiSW obowiązującego dla roku publikacji.
- Współczynnik wpływu (IF) podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułów opublikowanych w latach 2018 i 2019 podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2017.

8.2. Pozostałe dane bibliograficzne

Jestem autorem bądź współautorem łącznie **75** publikacji naukowych, w skład których wchodzi **70** oryginalnych prac naukowych oraz **5** prac przeglądowych. Spośród opublikowanych prac w **11** jestem pierwszym autorem, natomiast w **22** jestem drugim autorem.

- ❖ Podsumowanie cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS)/Core Collection:

Liczba prac cytowanych: **30**

Liczba cytowań (bez autocytowań): **76**

Liczba cytowań (z autocytowaniami): **98**

Index Hirscha według bazy Web of Science (WoS)/ Core Collection: **5**

- ❖ Podsumowanie cytowań publikacji według bazy Scopus:

Liczba prac cytowanych: **40**

Liczba cytowań (bez autocytowań): **175**

Liczba cytowań (z autocytowaniami): **203**

Index Hirscha według bazy Scopus: **6**

Wszystkie powyższe dane zostały podane zgodnie z raportem bibliometrycznym z dnia 21.02.2019 r., przygotowanym przez mgr inż. Jolantę Osiecką-Murawa Kierownika Oddziału Informacji Naukowej i Czytelni Czasopism, Biblioteki Uniwersyteckiej UWM w Olsztynie.

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych oraz szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej jak również innej działalności (wg Dz. U. Nr 196, poz. 116) zebrałam i przedstawiłam w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

9. Działalność dydaktyczna

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich biorę czynny udział w przygotowaniu i prowadzeniu ćwiczeń z przedmiotu „*Patomorfologia*” ze studentami III i IV roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W 2014 roku, po odejściu na emeryturę poprzedniego kierownika prof. dr hab. Tadeusza Rotkiewicza, zostałam również kierownikiem tego przedmiotu. Wiele energii i czasu zajęło mi przygotowywanie wykładów (do trwającego 3 semestry przedmiotu) i dostosowaniu ich jakości i przekazywanej wiedzy do standardów europejskich, w oparciu o najnowsze publikacje i pozycje książkowe. W tym samym czasie prowadziłam i dalej prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „*Patomorfologia*”, również ze studentami programu Erasmus, wykonując jednocześnie obowiązki kierownika Katedry Anatomii Patologicznej (od 01.05.2014), kierownika Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (od 24.02.2014) oraz głównego diagnosty patomorfologa. W ramach projektu „*Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie*” finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (Nr projektu: POKL.04.01.01- 00-095/10-00, lata realizacji 2010-2015) opracowałam i przygotowałam przedmiot fakultatywny „*Ocena cytologiczna i*

histopatologiczna płynów i tkanek zwierząt” dla studentów VI roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Fakultet ten który prowadzę do dnia dzisiejszego, cieszy się dużym zainteresowaniem wśród studentów. Ponadto prowadziłam wykłady i zajęcia praktyczne dla lekarzy weterynarii, słuchaczy specjalizacji „Choroby koni”, „Weterynaryjna Diagnostyka Laboratoryjna” oraz „Użytkowanie i patologia zwierząt laboratoryjnych”. W roku 2015 przeprowadziłam również cykl wykładów dla lekarzy weterynarii z tematyki „Onkologia małych zwierząt” oraz „Patologia chorób koni” w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

10. Działalność organizacyjna oraz usługowa

W trakcie mojej pracy zawodowej brałam czynny udział w działalności organizacyjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Od 01.10.20014 do chwili obecnej jestem członkiem Rady Wydziału, członkiem Wydziałowej Komisji Skrutacyjnej (od 01.10.2016 przewodniczącą tej komisji), oraz członkiem Wydziałowej Komisji Oceny Nauczycieli Akademickich. Od 2004 roku jestem również koordynatorem planów zajęć dydaktycznych z przedmiotu „Patomorfologia” oraz „Ocena cytologiczna i histopatologiczna płynów i tkanek zwierząt”. Od dnia 01.05.2014 kieruję Katedrą Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. W roku 2014 zostałam kierownikiem Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego oraz głównym diagnostą patomorfologiem. Obecnie laboratorium wykonuje badania diagnostyczne cytologiczne, histopatologiczne, immunohistochemiczne, sekcyjne oraz opinie lekarsko-weterynaryjne dla osób fizycznych, zakładów leczniczych oraz organów procesowych z terenu całej Polski, a liczba wykonywanych badań stale rośnie: 3 756 (2014), 4 495 (2015), 6 691 (2016), 8 606 (2017) 13 529 (2018). Ponadto aktywnie uczestniczyłam w przygotowaniu oraz obecnie uczestniczę w realizacji projektu „Innowacyjność technologii żywności wysokiej jakości” umowa o dofinansowanie nr RPWM.01.01.00-28-0002/17-00 realizowanego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Warmińsko-Mazurskiego, Działanie 1.1 „Nowoczesna infrastruktura badawcza publicznych jednostek naukowych”. Zadanie w którym uczestniczę obejmuje unowocześnienie infrastruktury badawczej Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Olsztyn, dn. 01.03.2019 r.

Iwona Otrocka-Domagala