

**Autoreferat**

**dr inż. Tatiana Wojciechowicz**

**Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt**

**Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach**

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Poznań, 2023

1. Imię i nazwisko.

**Tatiana Wojciechowicz**, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3651-0972>

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**Doktor (2006)** – stopień doktora nauk biologicznych w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biologia, specjalność fizjologia zwierząt nadany przez Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w dniu 22 września 2006 roku. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Leptyna i grelina w regulacji funkcji endokrynej jajnika świni*. Praca doktorska powstała pod opieką prof. dr hab. Krzysztofa W. Nowaka. Praca doktorska została wyróżniona.

**Magister inżynier (2001)** – obrona pracy magisterskiej pt. *Wpływ prolaktyny na aktywność kinazy białkowej C w komórkach osłonki wewnętrznej jajnika świni* w dniu 12 czerwca 2001 roku na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem pracy magisterskiej była prof. dr hab. Renata Ciereszko. Studia na kierunku biotechnologia (1996-2001) na UWM w Olsztynie zakończone uzyskaniem tytułu magistra inżyniera biotechnologii.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- Od 1.10.2009 – obecnie – **adiunkt** w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt (dawniej Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt) na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach (przed 2015 Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
  - urlop macierzyński 26.05.2007 – 31.02.2008
  - urlop macierzyński 26.04.2010 – 31.09.2010
- 1.10.2006 – 31.09.2009 – **asystent** w pełnym wymiarze etatu w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
- 1.10.2005 – 30.09.2006 – **asystent** (3/4 etatu na zastępstwo) w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu (od 2008 roku Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)
- 1.10.2001 – 30.09.2005 – **doktorant** w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

#### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

### **Rola peptydów regulujących pobieranie pokarmu w adipogenezie oraz wpływ na wybrane aspekty metabolizmu adipocytów**

#### 4.2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

1) **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Kołodziejski PA, Szczepankiewicz D, Pruszyńska-Oszmałek E, Kaczmarek P, Strowski MZ, Nowak KW. Obestatin stimulates differentiation and regulates lipolysis and leptin secretion in rat preadipocytes. *Molecular Medicine Reports* **2015**, 12(6): 8169-75.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4470>

**IF'2015: 1,559; IF'-5 letni<sub>2015</sub>: 1,617; IF'2021: 3,423; IF'-5 letni<sub>2021</sub>: 3,112; punkty MNiSW\*: 20 pkt.; obecna punktacja MEiN\*\*<sub>2021</sub>: 70 pkt.**

\* *Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) przed 2021 r*

\*\* *Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEiN) od 2021 r*

Udział własny i wkład merytoryczny habilitantki: zaprojektowanie badań, przeprowadzenie doświadczeń i analiz oraz sformułowanie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, uzyskanie finansowania (grant NCN numer: OPUS N N303 319337, pełniona funkcja: kierownik projektu)

2) **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Szczepankiewicz D, Hertig I, Kołodziejski PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW. Orexins A and B stimulate proliferation and differentiation of porcine preadipocytes. *Experimental Biology and Medicine* **2016**, 241(16):1786-1795

<https://doi.org/10.1177/153537021664>

**IF'2016: 2,688; IF'-5 letni<sub>2016</sub>: 2,512; IF'2021: 4,088; IF'-5 letni<sub>2021</sub>: 4,561; punkty MNiSW: 20 pkt.; obecna punktacja MEiN<sub>2021</sub>: 70 pkt.**

Udział własny i wkład merytoryczny habilitantki: udział w zaprojektowaniu badań, przeprowadzenie doświadczeń i analiz oraz sformułowanie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

**3) Wojciechowicz T, Billert M, Dhandapani P, Szczepankiewicz D, Wasielewski O, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M.** Neuropeptide B promotes proliferation and differentiation of rat brown primary preadipocytes. *FEBS Open Bio* **2021**, Apr;11(4):1153-1164  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13128>

**IF'2021: 2,797; IF'-5 letni<sub>2021</sub>: 2,676; obecna punktacja MEiN<sub>2021</sub>: 70 pkt.**

Udział własny i wkład merytoryczny habilitantki: zaprojektowanie badań, przeprowadzenie doświadczeń i analiz oraz sformułowanie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, uzyskanie finansowania (NCN OPUS 2016/21/B/NZ9/00943, pełniona funkcja: kierownik projektu)

**4) Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M.** Neuropeptide B promotes differentiation of rodent white preadipocytes into mature adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2023**, Feb15;562:111850.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111850>

**IF'2021: 4,329; IF'-5 letni<sub>2021</sub>: 4,467; obecna punktacja MEiN<sub>2021</sub>: 100 pkt.**

Udział własny i wkład merytoryczny habilitantki: zaprojektowanie badań, przeprowadzenie doświadczeń i analiz oraz sformułowanie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, uzyskanie finansowania (NCN OPUS 2016/21/B/NZ9/00943, pełniona funkcja: kierownik projektu)

**5) Wojciechowicz T, Kolodziejcki PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M.** The Effects of Neuropeptide B on Proliferation and Differentiation of Porcine White Preadipocytes into Mature Adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, Mar23;24(7):6096.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24076096>

**IF'2021: 6,208; IF'-5 letni<sub>2021</sub>: 6,628; obecna punktacja MEiN<sub>2021</sub>: 140 pkt.**

Udział własny i wkład merytoryczny habilitantki: zaprojektowanie badań, przeprowadzenie doświadczeń i analiz oraz sformułowanie wniosków, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, uzyskanie finansowania (NCN OPUS 2016/21/B/NZ9/00943, pełniona funkcja: kierownik projektu)

Podsumowanie parametrów naukometrycznych osiągnięcia habilitacyjnego:

Sumaryczny IF z roku opublikowania = **17,581**

Sumaryczny IF 5-letni z roku opublikowania = **17,900**

Sumaryczny IF – 5letni<sub>2021</sub> = **21,444**

Suma punktów MNiSW<sub>2021</sub> = **450**

#### 4.3 Omówienie celu naukowego wymienionych wyżej prac i osiągniętych wyników

##### *Wstęp*

Homeostaza energetyczna organizmów zwierzęcych stanowi bilans energii przyjmowanej w formie pokarmów i wydatkowanej na podstawowe procesy metaboliczne z uwzględnieniem wydatku energetycznego związanego z aktywnością fizyczną. Utrzymanie zrównoważonego bilansu energetycznego, z zachowaniem prawidłowej, fizjologicznej masy ciała jest kluczowe w zachowaniu dobrostanu i zdrowia oraz ma istotny wpływ na długość i jakość życia. Organizmy zwierzęce wykształciły ewolucyjnie tkankę tłuszczową – będącą odmianą tkanki łącznej, której jedną z pierwszych poznanych ról jest magazynowanie energii w postaci triglicerydów (TG). Proces ten jest regulowany przez wiele czynników biologicznie aktywnych wewnętrznych i żywieniowych, jednak z dominującą rolą insuliny. Pierwsza naukowa publikacja dotycząca tkanki tłuszczowej została opublikowana w 1933 roku [1] i aż do lat ‘80tych ubiegłego wieku tkankę tłuszczową traktowano jako bierny magazyn energii. Dominującymi i najlepiej poznаныmi procesami zachodzącymi w komórkach tkanki tłuszczowej są lipoliza i lipogeneza. Do chwili obecnej rozpoznano cztery rodzaje tkanki tłuszczowej zróżnicowane funkcjonalnie: poznaną jako pierwszą tkankę tłuszczową białą (*ang. white adipose tissue*, WAT; w języku polskim określaną tkanką tłuszczową żółtą) – głównie magazynującą triglicerydy; ponadto tkankę tłuszczową brunatną/brązową (*ang. brown adipose tissue*, BAT; zaangażowaną w spalanie zgromadzonych triglicerydów w sposób umożliwiający generowanie ciepła i regulację temperatury ciała) [2], różową [3] (występującą w gruczole mlekowym samic ssaków, posiadającą cechy komórek nabłonkowych wydzielniczych i zaangażowaną w produkcję składników mleka) oraz beżową [4] (wykazującą cechy pośrednie, włączające aktywność termogeniczną pod wpływem bodźców zewnętrznych np., iryzyny, obniżonej temperatury; po zaniku bodźca powracającą do metabolicznego profilu białych adipocytów). Komórki tkanki tłuszczowej, adipocyty, różnią się morfologią i aktywnością metaboliczną pomiędzy poszczególnymi typami tkanki tłuszczowej, ponadto, zaobserwowano metaboliczne różnice związane z miejscem występowania w organizmie, nawet w obrębie jednego typu tkanki. Przełomowym momentem w sposobie postrzegania tkanki tłuszczowej było odkrycie w 1994 roku leptyny [5]– nowo odkrytego wówczas hormonu wydzielanego przez adipocyty w sposób ilościowo skorelowany z zawartością lipidów w komórce. Leptyna informuje centralny układ nerwowy (CUN) o stanie zmagazynowanej energii w formie tłuszczu w organizmie jednocześnie hamując łaknienie i ograniczając spożycie pokarmów [6,7].

Entuzjastycznie okrzyknięto leptynę „hormonem sytości” i początkowo wydawało się, że będzie to prosta droga do opanowania problemu otyłości u ludzi. Niestety, mechanizm leptynooporności na poziomie podwzgórza [8], przy proporcjonalnie wysokim jej stężeniu w surowicy krwi ludzi otyłych, nie pozwoliły na praktyczne zastosowanie leptyny jako „leku na otyłość”. Kolejne odkrycia potwierdzające aktywność wydzielniczą tkanki tłuszczowej produkującej liczne hormony i peptydy biologicznie aktywne (m.in. adiponektyna [9], rezystyna [10], wisfatyna [11] interleukina 6 (IL-6), inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1), lipaza lipoproteinowa (LPL), czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), białko chemotaktyczne monocytów 1 (MCP-1) [12]) regulujące pracę licznych układów i narządów organizmu pozwalają obecnie patrzeć na tkankę tłuszczową jako na aktywny endokrynnie organ. Czynniki hormonalne wydzielane wyłącznie przez adipocyty i działające auto-, para- i endokrynnie wspólnie nazywamy adipokinami, a za najważniejsze z nich uważane są leptyna, adiponektyna i rezystyna. W organizmie są także inne tkanki i miejsca wydzielania wielu czynników biologicznie aktywnych i hormonów regulujących pobieranie pokarmu, a podzielono je na dwie grupy: czynniki anorektyczne i oreksygenne. Za efekty anorektyczne (anoreksygenne) odpowiedzialne są peptydy i hormony zmniejszające łaknienie i pobieranie pokarmu takie jak omówiona leptyna a ponadto transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę CART, nesfatyna 1, obestatyna, neuropeptydy B i W, GLP-1, insulina i inne. Efekt zwiększający pobieranie pokarmu, oreksygenne, wywołują hormony takie jak oreksyny A i B, galanina, neuropeptyd Y, opioidy ( $\beta$ -endorfina, dynorfina A i B), białko Agouti (AgRP), grelina. Znajomość kilkuset czynników aktywnych biologicznie wydzielanych przez komórki tkanki tłuszczowej oraz komórek współzysujących w tej tkance (komórki tkanki nerwowej, komórki zrębowo-naczyniowe i komórki odpornościowe) otwiera wciąż nowe możliwości zgłębiania wiedzy o ścieżkach regulacji i możliwości utrzymania homeostazy energetycznej organizmu.

Utrzymanie stałej masy ciała jest wynikiem zachowania równowagi energetycznej organizmów: kaloryczność pobieranych pokarmów musi być równoważna z wydatkowaną energią. Zaburzenie tej równowagi prowadzi do problemów z utrzymaniem masy ciała, zarówno w kierunku niedostatecznej (niedowaga, anoreksja) jak i nadmiernej (nadwaga, otyłość). Problemy z regulacją masy ciała obserwujemy szczególnie dotkliwie i ze wzrastającą tendencją u ludzi i na obszarach krajów wysoko rozwiniętych, gdzie łatwy dostęp do wysokokalorycznej, przetworzonej żywności sprzyja powstawaniu nadwagi i otyłości, które prowadzą do wielu chorób zespołu metabolicznego, nadciśnienia, chorób układu sercowo-

naczyniowego i cukrzycy z wieloma jej destrukcyjnymi następstwami [13]. Otyłość jest zarówno stanem obniżającym jakość życia, jak i istotnym czynnikiem skracającym długość życia. Utrzymanie zrównoważonej masy ciała jest także istotnym zagadnieniem w żywieniu zwierząt hodowlanych jak i towarzyszących - w przypadku tych drugich również notowane są przypadki otyłości wynikające z przekarmiania ich przedopiekunów. Rozwój nadwagi i otyłość są konsekwencją zaburzenia homeostazy energetycznej organizmu, jednak przyczyny prowadzące to tego stanu są wielorakie i złożone, zaczynając od podłoża genetycznego, po aspekty kulturowe, czynniki psychologiczne w tym poważne zaburzenia odżywiania o podłożu psychicznym, nawyki, tryb życia, rodzaj wykonywanej pracy i inne.

W otyłości dochodzi do przyrostu masy tkanki tłuszczowej białej, co jest wynikiem dwóch zjawisk: hipertrofii (wzrostu objętości komórki będącej następstwem zwiększenia ilości lipidów zgromadzonych w istniejących adipocytach – nasiloną lipogenezą) oraz hiperplazji (prolifracji komórek prekursorowych, zwanych preadipocytami oraz ich różnicowania - adipogenezy). Powstawanie komórek tłuszczowych jest jednym z aspektów regulacji masy ciała i wiąże się z rozwojem otyłości, która jest aktualnym problemem w wielu społeczeństwach. Adipogeneza to wieloetapowy i złożony proces powstawania z komórek prekursorowych o morfologii fibroblastycznej dojrzałych adipocytów wypełnionych kroplą (białe) lub kroplami (brązowe) tłuszczowymi [14]. Adipogeneza polega na proliferacji i różnicowaniu komórek co prowadzi do powstania dojrzałego adipocytu. W tkance tłuszczowej znajduje się, poza dojrzałymi adipocytami, frakcja komórek zrębowo-naczyniowych (SVF) zawierająca między innymi komórki macierzyste mezenchymalne (MSCs) które różnicują się z lipoblastów w preadipocytę i wreszcie w dojrzałe adipocyty. Frakcję komórek zrębowo-naczyniowych można izolować i w warunkach eksperymentalnych *in vitro* prowadzić proces adipogenezy, jednocześnie badając go pod wpływem różnych czynników biologicznie aktywnych. Ta strategia badawcza jest podstawą prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego. W skrócie, w przebiegu adipogenezy dochodzi do uruchomienia kaskady ekspresji czynników transkrypcyjnych dla kluczowych białek, które indukują ekspresję genów, tworząc dojrzałe adipocyty. Głównymi czynnikami kaskady molekularnej aktywowanej w trakcie adipogenezy są: receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR, głównie izoforma  $\gamma$ ), białka wiążące sekwencję wzmacniającą CCAAT (C/EBP, takie jak C/EBP  $\alpha$  i  $\beta$ ) i białko wiążące element regulatorowy genów enzymów biorących udział w syntezie steroli (SREBP). Kolejno, białko wiążące kwasy tłuszczowe 4 (FABP4, znane również jako białko adipocytowe 2, aP2), adiponektyna i syntaza kwasów tłuszczowych (FAS) są odpowiedzialne za



powstawanie dojrzałych adipocytów wypełnionych triglicerydami [15,16]. Pierwszym krokiem w różnicowaniu jest zatrzymanie wzrostu, tzw. *ang. growth arrest*, i etap ten jest niezbędny do indukcji programu adipogenezy. Następnie dochodzi do ekspresji specyficznych wczesnych, pośrednich i późnych markerów etapów różnicowania, ostatecznie prowadząc do akumulacji triglicerydów i powstania aktywnych metabolicznie dojrzałych adipocytów. Na wczesnym etapie różnicowania dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych C/EBP $\beta$  i PPAR $\gamma$  skorelowanego z zatrzymaniem wzrostu komórek. Kolejnym etapem jest indukcja ekspresji izoformy C/EBP $\alpha$ , który jest uważany za marker średniego stopnia zróżnicowania. Białko C/EBP $\alpha$  prowadzi do ekspresji promotorów genów FABP4, transportera glukozy typu 4 (GLUT-4), fosfenolopirogronianu karboksykinazy (PEPCK), leptyny i receptora insuliny. W procesie różnicowania, komórki prezentujące początkowo morfologię fibroblastyczną osiągają sferyczny kształt i zaczynają produkować elementy macierzy pozakomórkowej (ECM) [17]. W końcowym etapie adipogenezy silnie wzrasta lipogeneza *de novo*, a adipocyty stają się wrażliwe na insulinę [18,19]. Nowo utworzone dojrzałe adipocyty zachowują wysoką ekspresję PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$ .

Problematyka badawcza obejmująca rozprawę habilitacyjną jest skoncentrowana na regulacji adipogenezy. Badania prowadzone są z wykorzystaniem tkanek zwierząt doświadczalnych (szczura, świni) od których pobierano wycinki tkanki tłuszczowej białej i/lub brunatnej do izolacji komórek prekursorowych, stanowiących bezpośredni materiał biologiczny do założenia hodowli pierwotnej *in vitro*. Prace badawcze poszerzono także o wprowadzenie modelu ustalonej mysiej linii komórkowej 3T3-L1, której komórki są zdolne do różnicowania w adipocyty prezentujące metabolizm białej tkanki tłuszczowej. Tak prowadzona hodowla z dodatkiem czynników inicjujących proces różnicowania (adipogenezy) stanowi model różnicowania *in vitro*, który pozwala prowadzić badania wpływu endogennych biologicznie aktywnych peptydów (obestatyna, oreksyny A i B, neuropeptyd B) na przebieg procesu adipogenezy oraz wybrane aspekty metabolizmu i funkcji wydzielniczej tkanki tłuszczowej. Warto podkreślić, że gatunki zwierząt doświadczalnych takie jak szczur i mysz (rzęd: gryzonie, *Rodentia*) są uznanymi i wartościowymi organizmami modelowymi stosowanymi do badań nad biologią organizmów. Uzyskane wyniki można w pewnych aspektach odnosić do funkcjonowania organizmu człowieka, jednak w wielu aspektach różnią się metabolicznie od *Homo sapiens*. W świetle problematyki badawczej przedstawionego dokonania habilitacyjnego warto wspomnieć, że na przykład dobrze udokumentowana leptynooporność w modelu mysim nie ma tak jednoznacznego przełożenia w obserwacjach u człowieka [20]. Innym przykładem

może być odmienny profil obecności brunatnej tkanki tłuszczowej u gryzoni (obecna przez całe życie) i człowieka (obecna u dzieci i znacząco zmniejszona w życiu dorosłym – kiedyś uważano zanikająca). Biorąc powyższe pod uwagę, coraz częściej doceniamy fizjologię organizmu świni *Sus scrofa*, jako organizmu bardziej zbliżonego do człowieka pod względem anatomicznym, fizjologicznym i żywieniowym [21]. Z tego powodu organizm świni doskonale nadaje się jako model do badania aspektów zdrowia i chorób człowieka. Ponadto, w aspekcie hodowlanym, kształtowanie tkanki tłuszczowej u świń jest interesującym czynnikiem wpływającym na m.in. walory żywieniowe i smakowe produkcji mięsnej. Co ciekawe, uważa się, że świni nie posiadają tkanki tłuszczowej brunatnej, jedynie białą.

## Hipoteza i cel badawczy

Hipoteza badawcza zakładała udział peptydów regulujących pobieranie pokarmu w proliferacji i/lub procesie adipogenezy komórek tkanki tłuszczowej białej i/lub brunatnej. Do realizacji badań, które miały dać odpowiedź na postawioną hipotezę wybrano obestatynę i neuropeptyd B – peptydy o działaniu anorektycznym oraz oreksyny A i B wykazujące działanie oreksygenne.

Postawiona hipoteza pozwoliła na sformułowanie następujących celów badawczych:

1. Ocena wpływu obestatyny na adipogenezę, akumulację lipidów, lipolizę i sekrecję leptyny w trakcie procesu różnicowania preadipocytów białej tkanki tłuszczowej (WAT) szczura w hodowli *in vitro*.
2. Określenie roli oreksyn A i B na wzrost i adipogenezę preadipocytów białej tkanki tłuszczowej świni w przebiegu różnicowania *in vitro*.
3. Określenie potencjalnej ekspresji neuropeptydu B i jego receptora w preadipocytach brunatnej tkanki tłuszczowej szczura oraz ocenę wpływu neuropeptydu B na przeżywalność, wzrost, akumulację lipidów i adipogenezę preadipocytów BAT szczura.
4. Zbadanie potencjalnej ekspresji NPB i receptora w preadipocytach białej tkanki tłuszczowej szczura i komórkach mysiej linii 3T3-L1 oraz ocenę wpływu neuropeptydu B na proliferację i adipogenezę preadipocytów białej tkanki tłuszczowej gryzoni.
5. Ocena ekspresji neuropeptydu B i jego receptorów w preadipocytach białej tkanki tłuszczowej świni oraz określenie wpływu NPB na wzrost, akumulację lipidów i adipogenezę komórek WAT w hodowli różnicującej *in vitro*.

Uzyskane wyniki wniosą istotne aspekty w zrozumienie zależności w sieci regulacji procesów pobierania pokarmu i magazynowania energii w formie tkanki tłuszczowej skutkujące zbilansowaniem statusu energetycznego organizmu.

**Publikacja 1**

**Wojciechowicz T, Skrzypski M, Kołodziejcki PA, Szczepankiewicz D, Pruszyńska-Oszmałek E, Kaczmarek P, Strowski MZ, Nowak KW. Obestatin stimulates differentiation and regulates lipolysis and leptin secretion in rat preadipocytes. *Molecular Medicine Reports* 2015, 12(6): 8169-75**

W pracy podjęto rolę peptydu obestaty, zidentyfikowanej w 2005 roku [22], w regulacji adipogenezy (analiza ekspresji mRNA wybranych genów markerowych różnicowania: PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ ) oraz wybranych aspektów metabolizmu (lipoliza – na podstawie uwalniania glicerolu) i funkcji endokrynej tkanki tłuszczowej (sekrecja leptyny). Obestatin jest 23-aminokwasowym peptydem powstającym w wyniku proteolitycznego cięcia prekursora zwanego proopregreliną – wspólnego dla obestaty i greliny. Głównym źródłem obestaty jest żołądek, ponadto jest wydzielana w przewodzie pokarmowym, śledzionie, gruczole mlekowym oraz występuje w mleku i surowicy krwi [23]. Wieloletnie badania dowiodły, że grelina jest peptydem silnie stymulującym apetyt, zwanym „hormonem głodu”, a nadmierna produkcja tego hormonu sprzyja otyłości. Grelina w sposób istotny zwiększa pobieranie pokarmu a nadmierna produkcja tego hormonu prowadzi do rozwoju otyłości. Obestatin działa przeciwnie do greliny – stwierdzono, że obniża apetyt i hamuje pobieranie pokarmu [22]. Kluczowe aspekty działania obestaty polegają na hamowaniu uczucia głodu, ograniczaniu przyjmowania pokarmu, spowalnianiu perystaltyki przewodu pokarmowego co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia przyrostu masy ciała. Nazwa obestatin pochodzi od dwóch słów: łacińskiego *obedere* – „pożerać” i słowa *statin* oznaczającego „hamowanie” [22]. Wieloletnie badania potwierdziły zaobserwowane efekty antagonistycznego działania obu peptydów, niemniej jednak działanie obestaty ograniczające apetyt nie jest tak spektakularne jak oreksygenne działanie greliny, co więcej dalsze badania pokazały, że działanie obu peptydów jest bardziej kompleksowe i dotyczy wielu tkanek [24]. Przeciwnie działanie obu peptydów przejawia się również w regulacji sekrecji insuliny: oreksygeniczna grelina hamuje stymulowaną glukozą sekrecję insuliny [25–27], natomiast anorektycznie działająca obestatin zwiększa sekrecję insuliny w warunkach hiperglikemii [28]. Oba peptydy są zaangażowane nie tylko w regulację procesu pobierania pokarmu, ale także w regulację gospodarki energetycznej organizmu poprzez wpływ na sekrecję insuliny. Istotną przesłanką wspierającą hipotezę potencjalnego wpływu obestaty komórki tkanki tłuszczowej było wykazanie ekspresji obu izoform receptora obestaty (GPR39-1a – aktywna, posiadająca pełną siedmiokrotnie przenikającą błonę komórkową forma receptora oraz

GPR39-1b – nieaktywna forma posiadające jedynie pięć domen transbłonowych) w tkance tłuszczowej WAT [29,30] i komórkach 3T3-L1 myszy. W tym czasie nie było danych badawczych dotyczących potencjalnej roli obestatyiny w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej i jej komórek – tak ważnych z punktu widzenia gospodarki energetycznej organizmu. Dlatego też podjęłam nowatorskie badania stawiające taką hipotezę badawczą i uzyskałam finansowanie grantu OPUS z Narodowego Centrum Nauki pt.: „Rola obestatyiny w regulacji metabolizmu adipocytów białej tkanki tłuszczowej szczura”, który realizowałam w latach 2009-2013 (NCN N N303 319337).

**Celem podjętych badań było określenie roli obestatyiny w procesie adipogenezy oraz jej wpływu na wybrane aspekty funkcjonowania metabolicznego komórek tłuszczowych.** Materiałem badawczym w realizacji badań były izolowane preadipocyty okołojądrowej tkanki tłuszczowej szczura (typ białej tkanki tłuszczowej) w hodowli *in vitro*, które poddano ekspozycji na pożywkę hodowlaną zawierającą czynniki indukujące proces różnicowania (insulinę, trójiodotyroninę i deksametazon) w obecności obestatyiny (1, 10 i 100 nM) lub bez dodatku badanego peptydu (kontrola). Wykorzystując model badawczy hodowli różnicującej *in vitro* wykazano, że obestatyina zwiększa akumulację lipidów (pomiar ilości akumulowanej czerwieni olejowej O w powstających w trakcie różnicowania kroplach lipidowych w komórce) w pierwszym i drugim dniu adipogenezy oraz powoduje wzrost ekspresji markerów różnicowania (*Ppar $\gamma$* , *C/ebpa*, *C/ebp $\beta$* ) w trakcie adipogenezy *in vitro*. Obestatyina zwiększyła ekspresję *C/ebp $\beta$* , genu wczesnego etapu różnicowania już pierwszym dniu adipogenezy, kolejno badany peptyd zwiększył ekspresję *C/ebpa* i *Ppar $\gamma$*  – których ekspresja pozostała na podwyższonym poziomie w obecności obestatyiny do końca procesu adipogenezy i uzyskania przez komórki fenotypu dojrzałych adipocytów białej tkanki tłuszczowej. Ponadto, wykazano, że obestatyina hamuje lipolizę (mierzoną obniżeniem wydzielania glicerolu do pożywki hodowanej) we wczesnych etapach różnicowania *in vitro* (dzień 2) natomiast w późnym etapie różnicowania (dzień 5 – adipocyty zróżnicowane) obestatyina stymuluje lipolizę (zwiększa wydzielanie glicerolu). Wyniki wskazują, że obestatyina działa w trakcie różnicowania dwufazowo: promuje adipogenezę, zwiększa akumulację lipidów i ogranicza lipolizę w pierwszym etapie procesu powstawania komórek tłuszczowych, natomiast działając na dojrzałe adipocyty powoduje zwiększenie lipolizy. Badania własne wykazały ponadto, że obestatyina stymuluje uwalnianie leptyny („hormonu sytości”) z dojrzałych, zróżnicowanych *in vivo*, adipocytów. Podsumowując, wyniki opublikowane w oryginalnej pracy pokazują, że obestatyina jest peptydem:

- regulującym proces adipogenezy: stymuluje różnicowanie – wykazano wzrost ekspresji (*Ppar $\gamma$* , *C/ebpa*, *C/ebp $\beta$* );
- regulującym funkcje sekrecyjne: zwiększa wydzielanie leptyny;
- regulującym wybrane aspekty metabolizmu adipocytów: moduluje lipolizę zależnie od stanu stopnia zróżnicowania adipocytów.

Od roku 2011 opublikowano kilka doniesień pokazujących udział obestatyny w funkcji komórek tkanki tłuszczowej: stymulacja dokomórkowego transportu glukozy przez aktywację kinazy białkowej B (Akt) w komórkach linii 3T3-L1 [31]; zmniejszenie lipolizy (mierzonej uwalnianiem NEFA i glicerolu) w adipocytach linii 3T3-L1 [32]. W toku realizacji grantu badawczego, którym kierowałam powstały prace, w których zawarto uzyskane wyniki: potwierdzenie ekspresji receptora GPR39 w adipocytach szczura, promowanie lipolizy, hamowanie lipogenezy oraz dokomórkowego transportu glukozy w zróżnicowanych adipocytach szczura [33] – oraz omawiana publikacja [34], która jest częścią prezentowanego osiągnięcia przedstawiającego stymulujący efekt obestatyny na proces adipogenezy *in vitro*. Głównym osiągnięciem przedstawionych badań było pokazanie po raz pierwszy, że obestatyna stymuluje adipogenezę różnicowanych *in vitro* komórek prekursorowych szczura.

## Publikacja 2

Wojciechowicz T, Skrzypski M, Szczepankiewicz D, Hertig I, Kołodziejcki PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW. Orexins A and B stimulate proliferation and differentiation of porcine preadipocytes. *Experimental Biology and Medicine* **2016**, 241(16):1786-1795

Jednymi z neuropeptydów o silnym działaniu oreksygenneym - zwiększającym pobieranie pokarmu są, odkryte w 1998 roku przez dwa niezależne zespoły badawcze, oreksyny (hipokretyny) A (OXA) i B (OXB) [35,36]. Oreksyna A składa się z 33, a oreksyna B z 28 aminokwasów i oba peptydy powstają w wyniku proteolizy ze wspólnego prekursora zwanego preprooreksyną. Oba peptydy działają przez dwa zidentyfikowane receptory sprzężone z białkami G: OXR1 i OXR2, przy czym wykazano, że oreksyna A wiąże się do obu typów receptora, podczas gdy oreksyna B jest wiązana głównie przez receptor 2. Dobrze poznano działanie oreksyn w obrębie CUN, i wykazano że oreksyny regulują homeostazę energetyczną zwiększając pobieranie pokarmu i promują wydatkowanie energii [35,37], biorą udział w procesach uczenia się i pamięci [38], regulują rytm sen-czuwanie - zaburzenia funkcjonowania systemu oreksyn w OUN odpowiadają za narkolepsję [39]. Włókna nerwowe wydzielające na zakończeniach oreksyny są obecne w wielu tkankach obwodowych, dlatego ogromnym zainteresowaniem cieszyły się badania dotyczące roli hipokretyn w regulacji funkcjonowania tkanek obwodowych. Efektem tych badań było między innymi potwierdzenie wpływu oreksyn na regulację poziomu glukozy we krwi poprzez ich oddziaływanie na wydzielanie glukokortykoidów z nadnerczy [40], a glukagonu [41] oraz insuliny [42] z wysp trzustkowych. Wykazano także, że oreksyny oddziałują na tkankę tłuszczową u ludzi i gryzoni. Oreksyna A stymuluje ekspresję Ppar $\gamma$  i hamuje lipolizę w adipocytach białej tkanki tłuszczowej człowieka [43]. U gryzoni wykazano, że oreksyna A zwiększa dokomórkowy transport glukozy, akumulację triglicerydów i ekspresję oraz sekrecję adiponektyny w adipocytach 3T3-L1 oraz izolowanych dojrzałych adipocytach szczura [44]. Przeprowadzono także badania dotyczące wpływu oreksyny A na preadipocyty gryzoni i stwierdzono, że peptyd ten stymuluje proliferację i hamuje apoptozę mysich preadipocytów linii 3T3-L1 oraz preadipocytów szczura *in vitro* [45,46]. Stymulacja proliferacji preadipocytów przez oreksynę A może prowadzić do hiperplazji tkanki tłuszczowej i może sprzyjać rozwojowi otyłości, co w powiązaniu ze stymulacją pobierania pokarmu stanowi niekorzystny efekt, który należy uwzględnić w ocenie bilansu energetycznego organizmu. Dość dobrze poznana rola oreksyn u gatunków modelowych takich jak szczur i mysz a także u ludzi, budziła wciąż zainteresowanie w



przypadku innych gatunków zwierząt, na przykład hodowlanych. Czynniki wpływające na pobieranie pokarmu oraz powstawanie i metabolizm tkanki tłuszczowej u zwierząt istotnych w gospodarce budzą zainteresowanie zarówno ze względu na aspekt żywienia i chowu tych zwierząt ale także uwzględniając potrzeby i preferencje żywieniowe konsumentów.

Uwzględniając te aspekty, **celem badań było określenie roli oreksyny A i B w proliferacji i różnicowaniu preadipocytów świni w hodowli *in vitro* oraz ich wpływ na wybrane aspekty metabolizmu adipocytów.** Pracę rozpoczęto od podjęcia próby potwierdzenia ekspresji receptorów OXR1 i OXR2 na poziomie mRNA i białka, a następnie badano wpływ obu oreksyn na proliferację preadipocytów. W kolejnych doświadczeniach badano aspekty adipogenezy takie jak akumulacja lipidów w komórkach (barwienie czerwienią olejową O) i ekspresja Ppar $\gamma$ , C/ebp $\alpha$ , C/ebp $\beta$ , Lpl, leptyny. Ponadto analizowano czy oreksyny mają wpływ na lipolizę (uwalnianie glicerolu) i wydzielanie leptyny – wybrane aspekty metabolizmu adipocytów. Tkankę tłuszczową świni pobierano od 5-7 dniowych warchlaków rasy złotnickiej z grzbietowej międzyłopatkowej tkanki podskórnej, po izolacji komórek frakcji zrębowo-naczyniowej bogatej w preadipocyty zakładano hodowlę pierwotną. W celu określenia wpływu oreksyn na proliferację komórki hodowano przez jedną dobę z peptydami, bez indukcji różnicowania, natomiast pozostałe doświadczenia (ekspresja i wydzielanie leptyny, ekspresja mRNA markerów różnicowania) były prowadzone w układzie hodowli różnicującej, tj., z zastosowaniem pożywki hodowlanej uzupełnionej w czynniki inicjujące adipogenezę (insulina, deksametazon i trijodotyronina) oraz w obecności oreksyny A i B przez 1, 3 i 6 dni. Wpływ oreksyn na lipolizę (uwalnianie glicerolu) i akumulację lipidów (lipogenezę) badano w szóstym dniu hodowli różnicującej.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono:

- ekspresję obu typów receptora OXR1 i OXR2 w hodowanych *in vitro* preadipocytach świni; na poziomie mRNA obecność receptorów wykazano we wszystkich badanych punktach czasowych (1, 3 i 6 dzień różnicowania); na poziomie białka stwierdzono że ekspresja OXR1 jest istotnie wyższa w porównaniu do OXR2 w szóstym dniu adipogenezy;
- oreksyny A i B stymulują różnicowanie preadipocytów świni – wykazano wzrost ekspresji mRNA genów markerowych odpowiedzialnych za adipogenezę (Ppar $\gamma$ , C/ebp $\alpha$ , Lpl – pod wpływem OXA; Ppar $\gamma$ , C/ebp $\beta$ , Lpl – pod wpływem OXB);
- oreksyny A i B w dawce 100 nM zwiększają akumulację lipidów w szóstym dniu różnicowania;



- oreksyny A i B hamowały lipolizę (uwalnianie glicerolu) w zróżnicowanych *in vitro* (6 dzień) adipocytach świni;
- oreksyny A i B zwiększyły ekspresję mRNA leptyny w pierwszym dniu adipogenezy, jednocześnie nie stwierdzono wpływu oreksyn na sekrecję leptyny przez komórki do pożywki hodowlanej;
- oba peptydy, oreksyna A oraz oreksyna B (100nM) zwiększyły proliferację preadipocytów świni w warunkach hodowli *in vitro*.

Podsumowując, wyniki wskazują na zaangażowanie oreksyny A i B w regulację powstawania (zwiększają proliferację) oraz formowania (stymulują różnicowanie) nowych komórek białej tkanki tłuszczowej świni działając poprzez receptory oreksyn typu 1 i 2, których obecność wykazano na preadipocytach świni. Oreksyny mogą regulować status energetyczny organizmu przez promowanie powstawania komórek tkanki tłuszczowej. Uzyskane wyniki potwierdzają udział oreksyn w powstawaniu i funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej świni. Ponadto, dzięki podobieństwom fizjologicznym i typu żywieniowego (wszystkożerne) tego gatunku do ludzi pozwalają na uzupełnienie wiedzy o rozwoju tej tkanki u człowieka, włączając badania nad rozwojem otyłości.

**Publikacja 3**

**Wojciechowicz T, Billert M, Dhandapani P, Szczepankiewicz D, Wasielewski O, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M.** Neuropeptide B promotes proliferation and differentiation of rat brown primary preadipocytes. *FEBS Open Bio* **2021**, Apr;11(4):1153-1164

W regulację procesu pobierania pokarmu jest zaangażowany anorektycznie działający neuropeptyd B (NPB). Ten 29-aminokwasowy peptyd, o unikatowej modyfikacji bromem przy N-końcowym tryptofanie, odkryty został w 2002 roku [47]. Działanie NPB na komórki docelowe odbywa się przez dwa receptory sprzężone z białkami G: NBWR1 (GPR7) i NPBWR2 (GPR8) [47,48]. Obie izoformy receptora NPB wykazują 70% podobieństwo sekwencji nukleotydowej i 64% aminokwasowej, ponadto homologię z receptorami opioidowymi i somatostatynowymi. Co ciekawe, u gryzoni występuje jedynie NBPWR1, natomiast oba receptory są obecne u człowieka, kury, świni oraz ryżanki japońskiej [49]. Warto dodać, że oba receptory wiążą pokrewny neuropeptyd W, a oba peptydy, NPB i NPW powstają ze wspólnego prekursora w wyniku cięcia proteolitycznego. Ekspresję receptorów oraz samego neuropeptydu B wykazano w wielu strukturach centralnego układu nerwowego oraz w tkankach obwodowych (m.in. w żołądku, wątrobie, trzustce, gonadach męskich i żeńskich, nerkach, tkance tłuszczowej i innych). Neuropeptyd B, poprzez interakcję z receptorami sprzężonymi z białkami G i m. in. hamowanie aktywności cykazy adenylowej, spadek ilości cAMP, odgrywa rolę w regulowaniu zachowań żywieniowych (hamuje pobieranie pokarmu), homeostazie energetycznej, funkcji neuroendokrynnej, rytmu snu i czuwania, funkcji rozrodczych; ponadto reguluje ból zapalny oraz moduluje czucie bólu jak również niepokoję. Niedługo po zidentyfikowaniu NPB, Ishi i wsp. [50] przedstawili efekt wyciszenia receptora NPBWR1 (GPR7) u samców myszy, które rozwijały otyłość w wieku dorosłym, która postępowała z wiekiem podczas bytowania z dostępem do wysoko tłuszczowej karmy. Samce myszy GPR7<sup>-/-</sup> miały fenotyp charakterystyczny dla hiperfagii oraz stwierdzono u tych osobników zmniejszony wydatek energetyczny i aktywność lokomotoryczną. W osoczu krwi zaobserwowano podwyższone poziomy: glukozy, leptyny i insuliny oraz obniżony poziom mRNA neuropeptydu Y (NPY) w podwzgórze i zwiększony poziom mRNA proopiomelanokortyny (POMC) - zestaw efektów przeciwnych do tych jakie prezentują myszy *ob/ob* z brakiem receptora leptyny. Warto zauważyć, że NPY stymuluje pobieranie pokarmu, natomiast POMC wywołuje efekt odwrotny, anorektyczny, synergiczny do działania NPB. Udział systemu neuropeptydów B i W w rozwoju otyłości skłonił mnie do aplikowania o

dofinansowanie badań do Narodowego Centrum Nauki, wynikiem czego uzyskałam środki na realizację projektu OPUS NCN 2016/21/B/NZ9/00943.

**Celem badań realizowanych w ramach grantu było określenie roli neuropeptydu B w powstawaniu komórek tkanki tłuszczowej**, co może mieć istotny wpływ na status energetyczny organizmu, którego zaburzenie może być przyczyną rozwoju otyłości związanej z przyrostem tkanki tłuszczowej. Cel ten był realizowany z wykorzystaniem dwóch typów tkanki tłuszczowej szczura, białej oraz brunatnej, a ponadto sięgnęłam po mysie komórki ustalonej linii fibroblastycznej 3T3-L1 jako model adipogenezy w kierunku białej tkanki tłuszczowej. Starając się zbliżyć do organizmu wykazującego podobieństwa fizjologiczne do człowieka, oraz wykazującego podobnie jak człowiek, ekspresję obu receptorów neuropeptydu B (NPBWR1 i NPBWR2), badania przeprowadziłam na izolowanych preadipocytach świni – stanowiących typ komórek białej tkanki tłuszczowej. Efekty badań w ramach realizacji grantu zostały opublikowane w trzech oryginalnych pracach, przedstawionych do osiągnięcia habilitacyjnego pod numerami 3, 4 oraz 5.

W publikacji nr 3, zebrałam wyniki efektów działania neuropeptydu B na wzrost i różnicowanie szczyrzych preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej. Materiałem badawczym były preadipocyty izolowane z międzyłopatkowego depozytu brunatnej tkanki tłuszczowej młodych osobników (o masie ciała ok. 100g odpowiadającego wiekowi ok. 6 tygodni). W pierwszej kolejności zweryfikowano obecność receptora NPBWR1 oraz potencjalną ekspresję samego peptydu w komórkach w pierwszym, trzecim oraz siódmym dniu hodowli różnicującej. Uzyskane wyniki potwierdziły ekspresję mRNA oraz peptydu NPB we wszystkich badanych punktach czasowych, a ilość peptydu NPB w 3 i 7 dniu adipogenezy spadała w porównaniu do pierwszego dnia hodowli różnicującej, gdzie ekspresja była najwyższa. Potwierdzono także ekspresję mRNA oraz białka receptora NPBWR1 we wszystkich dniach hodowli różnicującej, na stabilnym, wyrównanym poziomie. Wyniki te sugerują możliwość działania neuropeptydu B na komórki brunatnej tkanki tłuszczowej drogą neuroendokrynną jak i para- czy autokrynną. Przeżywalność (mierzona testem MTT) oraz proliferacja (mierzona inkorporacją BrdU do genomu dzielących się komórek za pomocą testu ELISA) były badane w 24-godzinnej hodowli w pożywce z dodatkiem neuropeptydu B. Wpływ NPB na proces adipogenezy był analizowany na podstawie ekspresji markerów różnicowania charakterystycznych dla brunatnej tkanki tłuszczowej (*Prdm16*, *Pparγ*, *Ucp1*, *Pref1*). PRDM16 to czynnik transkrypcyjny, który odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu i metabolizmie brunatnej tkanki tłuszczowej, takim jak brązowienie i termogeneza adipocytów, a także beżowienie adipocytów. Temogenina (UCP1)

to białko rozprzegające, które jest kluczowym enzymem szlaku termogenezy. Ma ono postać kanału jonowego wbudowanego w wewnętrzną błonę mitochondrium przepuszczalnego dla jonów wodorowych prowadzące do rozproszenia energii w ciepło. Czynniki preadipocytów 1 (PREF1) jest obecny w preadipocytach i hamuje różnicowanie adipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej [51]. Ponadto, oceniano wpływ Neuropeptydu B na akumulację lipidów w różnicujących się komórkach brunatnej tkanki tłuszczowej (barwienie ORO i elucja czerwieni olejowej O z oceną spektrofotometryczną) jako pośrednia metoda oceny stopnia zróżnicowania komórek. Dodatkowo, analizowano czy neuropeptyd B ma wpływ na metabolizm zróżnicowanych *in vitro* brunatnych adipocytów na podstawie wpływu NPB na stymulowane adrenaliną zużycie tlenu. Warto podkreślić, że podjęto także próbę odpowiedzi na pytanie jakie elementy ścieżki wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału biorą udział w wywoływanych przez neuropeptyd B efektach na adipogenezę BAT szczura.

W pracy nr 3 przedstawiono efekty badań, do których należą:

- wykazanie ekspresji neuropeptydu B oraz receptora *Npbwr1* w różnicujących się adipocytach brunatnej tkanki tłuszczowej szczura oraz stwierdzenie, że: ekspresja peptydu była największa w pierwszym dniu adipogenezy i spadała w kolejnych dniach i etapach procesu różnicowania; ekspresja receptora *Npbwr1* była na równym poziomie i nie ulegała zmianom w kolejnych etapach adipogenezy;
- wykazanie, że neuropeptyd B zwiększył przeżywalność oraz proliferację preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej;
- potwierdzenie, że ekspresja mRNA czynników markerowych procesu różnicowania, *Prdm16*, *Ucp1* była zwiększona pod wpływem NPB; nie stwierdzono zmian w ekspresji czynnika *Pparγ*;
- wykazano, że neuropeptyd B zmniejsza ekspresję anty-różnicującego czynnika *Pref1* w pierwszym dniu adipogenezy;
- wykazanie wzrostu ekspresji białka UCP1 w siódmym dniu adipogenezy pod wpływem neuropeptydu B;
- wykazanie zwiększonej akumulacji lipidów pod wpływem NPB w pierwszym i trzecim dniu adipogenezy;
- wykazanie wzrostu konsumpcji tlenu pod wpływem NPB wobec zużycia podstawowego oraz stymulowanego adrenaliną przez zróżnicowane przez 7 dni komórki brunatnej tkanki tłuszczowej;

- określenie udziału fosforylacji kinazy p38 jako elementu ścieżki sygnałowej przenoszącej efekty działania NPB na preadipocyty BAT szczura, jednocześnie stwierdzono brak udziału kinazy ERK1/2;
- wykazano, że farmakologiczne zablokowanie fosforylacji kinazy p38 (zastosowanie blokera SB239063) znosiło wzrost ekspresji mRNA UCP1 pod wpływem neuropeptydu B.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań dotyczących działania neuropeptydu B na adipogenezę i wybrany aspekt metabolizmu (zużycie tlenu) brunatnych komórek tkanki tłuszczowej szczura pokazały, że peptyd ten promuje przeżywalność i proliferację preadipocytów – może stymulować hiperplazję tkanki tłuszczowej brunatnej; jednocześnie NPB promuje adipogenezę BAT oraz zwiększa zużycie tlenu w procesie oddychania komórkowego prowadzącego w BAT do uzyskania ciepła w wyniku rozpręgnięcia fosforylacji oksydacyjnej. Efekty te są realizowane z udziałem aktywacji, poprzez fosforylację, kinazy p38. Kinaza p38 należy do rodziny kinaz aktywowanych mitogenami MAPK, które w tkance tłuszczowej są zaangażowane w proces adipogenezy [52,53].

Warto podkreślić, że obecność tkanki tłuszczowej brunatnej ma korzystną korelację z utrzymaniem stałej masy ciała i bilansu energetycznego, przeciwnie do negatywnej roli wzrostu ilości białej tkanki tłuszczowej wobec homeostazy energetycznej. Przez wiele lat sądzono, że brunatna tkanka tłuszczowa jest obecna przez całe życie u gryzoni oraz w okresie noworodkowym i wczesno niemowlęcym u naczelnych. Ponadto, BAT pełni także szczególną rolę u zwierząt hibernujących. Obecnie potwierdzono obecność niewielkich ilości komórek brunatnej tkanki tłuszczowej u człowieka w życiu dorosłym, zlokalizowanych w okolicy nadobojczykowej oraz szyi a także rozsianych jako pojedyncze komórki w różnych miejscach białej tkanki tłuszczowej. Poznanie możliwości transróżnicowania komórek białej tkanki tłuszczowej w brunatne i na odwrót, zostało potwierdzone i zachodzi pod wpływem czynników takich jak np. obniżona temperatura ciała i stymulacja receptorów  $\beta_3$ -adrenergicznych. Co ciekawe, zaobserwowano, że częstość występowania brunatnej tkanki tłuszczowej jest większa u kobiet oraz, że jej ilość maleje z wiekiem a także wraz ze wzrostem masy ciała. Inaczej mówiąc, osoby szczupłe mają większą ilość komórek BAT niż osoby z nadmierną masą ciała, nadwagą oraz otyłością. Prowadzi to do wnioskowania, że aktywna brunatna tkanka tłuszczowa może zapobiegać otyłości oraz insulinooporności. Wydaje się, że metabolizm substratów energetycznych zmagazynowanych w postaci triglicerydów w brunatnej tkance tłuszczowej oraz uwolnienie powstałej energii w postaci ciepła ma pozytywny efekt na homeostazę

energetyczną i utrzymanie masy ciała, podczas gdy, magazyn lipidów w WAT nie może być uszczuplony tą drogą i kumulując się obciąża organizm prowadząc do otyłości i powikłań metabolicznych z tym związanych łącznie z rozwojem syndromu metabolicznego i cukrzycy typu 2.

Pozwala to wnioskować że, choć NPB stymuluje różnicowanie zarówno BAT jak i WAT, jednakże korzystny dla bilansu energetycznego może być efekt stymulacji proliferacji wyłącznie komórek BAT – wzrost ich ilości może sprzyjać zapobieganiu rozwojowi otyłości. Takie wnioskowanie wymaga weryfikacji i może to stanowić interesujący wątek do dalszych badań.

**Publikacja 4**

**Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Neuropeptide B promotes differentiation of rodent white preadipocytes into mature adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2023, Feb15;562:111850.**

W ramach realizacji grantu podjęto prace których celem było zbadanie potencjalnej roli neuropeptydu B w różnicowaniu preadipocytów białej tkanki tłuszczowej. Doświadczenia były realizowane w układzie hodowli pierwotnej różnicującej *in vitro* izolowanych preadipocytów frakcji zrębowo naczyniowej pozyskanej z okołojądrowej białej tkanki tłuszczowej szczurów oraz linii komórkowej 3T3-L1. Ustalona linia komórkowa 3T3-L1 jest jedną z najpowszechniej stosowanych modelowych linii komórek różnicujących się w adipocyty białej tkanki tłuszczowej, a została pozyskana z embrionów myszy. Prace doświadczalne rozpoczęłam od zbadania ekspresji neuropeptydu B oraz receptora *Npbwr1* w obu typach komórek gryzoni. W kolejnych eksperymentach sprawdzano potencjalny wpływ NPB na przeżywalność i wzrost komórek w hodowli 24-godzinnej preadipocytów. Następnie, w trakcie prowadzonych hodowli różnicujących (zastosowano pożywki różnicujące uzupełnione induktorami różnicowania i/lub dodatek NPB) analizowano ekspresję mRNA oraz powstałych białek genów markerowych procesu różnicowania (*Pparγ*, *C/ebpβ*, *C/ebpa*, białko wiążące kwasy tłuszczowe 4 (*Fabp4*)). Różnicowanie komórek pierwotnych szczura analizowano w trzech punktach czasowych przebiegu procesu adipogenezy (1, 3 i 7 dzień), natomiast biorąc pod uwagę inną dynamikę różnicowania komórek linii 3T3-L1 analizy dotyczyły 1 i 7 dnia różnicowania (wczesny i końcowy etap adipogenezy). Ponadto, określono potencjalny wpływ neuropeptydu B na akumulację triglicerydów w powstających kroplach lipidowych. Podjęto także zadanie prześledzenia wewnątrzkomórkowej ścieżki transdukcji sygnału po związaniu NPB w receptorem komórek białej tkanki tłuszczowej gryzoni. W oparciu o dane literaturowe, możliwe było wskazanie potencjalnego udziału kinaz MAPK p38 i ERK1/2 i/lub kinazy AKT (kinazy białkowej B).

Wyniki otrzymane z powyżej opisanych eksperymentów umożliwiły sformułowanie wniosków odpowiadających na postawione cele:

- neuropeptyd B ulega ekspresji w trakcie różnicowania w komórkach tłuszczowych szczura oraz myszy; zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA oraz peptydu neuropeptydu B postępie procesu adipogenezy w porównaniu do dnia pierwszego w



komórkach szczura oraz wzrost peptydu NPB w zróżnicowanych adipocytach linii 3T3-L1 w porównaniu do początkowego etapu różnicowania;

- receptor NPBWR1 ulega ekspresji w różnicujących adipocytach gryzoni; w komórkach szczura ekspresja mRNA i białka receptora była na stałym poziomie, natomiast w komórkach mysich 3T3-L1 stwierdzono wzrost ekspresji zarówno mRNA jak i białka receptora w trakcie adipogenezy;
- neuropeptyd B nie ma wpływu ani na przeżywalność, ani na proliferację preadipocytów szczura i myszy;
- neuropeptyd B promuje adipogenezę u gryzoni: zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA i białka wybranych i wymienionych powyżej genów markerowych procesu różnicowania; warto podkreślić, że widoczny jest efekt promowania adipogenezy na początkowym etapie procesu, dzięki czemu adipogeneza postępuje szybciej, a efekt ten słabnie pod koniec różnicowania;
- neuropeptyd B przyspiesza i zwiększa akumulację triglicerydów w kroplach lipidowych w początkowym etapie różnicowania pierwotnych komórek szczura (dzień 1 adipogenezy), oraz NPB zwiększa ilość trójglicerydów zgromadzonych w zróżnicowanych adipocytach mysich komórek 3T3-L1. W tym przypadku widoczne są różnice w dynamice działania neuropeptydu B wynikające, w mojej ocenie, z cech metabolicznych zdrowych, normalnych komórek izolowanych bezpośrednio z tkanki i różnicowanych w hodowli pierwotnej w porównaniu do ustalonej ciągłej (transformowanej nowotworowo) linii komórkowej. Niemniej jednak, neuropeptyd B wykazał potencjał stymulujący akumulację lipidów w trakcie przebiegu procesu adipogenezy w obu badanych modelach komórkowych: w początkowym etapie w prawidłowych komórkach szczura i na końcowym etapie różnicowania unieśmiertelnionej ciągłej linii mysiej;
- neuropeptyd B wywołuje efekt promujący adipogenezę działając poprzez aktywację p38, natomiast nie aktywuje fosforylacji kinaz AKT i ERK1/2. Mechanizm aktywacji ścieżki sygnałowej z udziałem kinazy p38 potwierdzono używając farmakologicznego blokera (SB239063) tej kinazy: inhibitor zniósł efekt stymulacji fosforylacji p38 przez NPB oraz zablokował stymulowaną NPB ekspresję mRNA *Ppar $\gamma$*  i *C/ebp $\beta$* .

Przedstawione powyżej badania, wykonane w modelu adipogenezy *in vitro*, nie wyjaśniają w pełni fizjologicznej roli neuropeptydu B w warunkach *in vivo* oraz udziału peptydu w etiologii otyłości. Należy pamiętać, że zarówno myszy z ubytkiem NPB jak i



NPBWR1 rozwijają łagodnie wczesną otyłość [50,54] i wydaje się że *in vivo* neuropeptyd B wykazuje działanie antyadipogeniczne. Niemniej jednak nie wiadomo, czy otyłość wynika ze zwiększonej adipogenezy, czy z przyrostu masy tkanki tłuszczowej (hipertrofii). W tym kontekście warto zauważyć, że myszom z niedoborem NPBWR1 towarzyszy zwiększona masa ciała przy zmniejszonym wydatku energetycznym oraz także zmniejszona aktywność lokomotoryczna [50]. Rozwój otyłości jest wielorako złożonym procesem, a w warunkach *in vivo* bardzo dużo czynników działa jednocześnie, potęgując lub znosząc swoje działanie. Dlatego tak ważne są badania zarówno *in vitro* jak i całościowe *in vivo*. Biorąc pod uwagę uzyskany efekt stymulujący proliferację preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej szczura (praca nr 3) oraz brak tego efektu w komórkach białej tkanki tłuszczowej gryzoni, niewykluczone, że neuropeptyd B może korzystnie wpływać na bilans energetyczny w aspekcie udziału ilościowego adipocytów brunatnych względem białych. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji i może stanowić interesującą kontynuację podjętej tematyki.

## Publikacja 5

**Wojciechowicz T, Kolodziejcki PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M.** The Effects of Neuropeptide B on Proliferation and Differentiation of Porcine White Preadipocytes into Mature Adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, Mar23;24(7):6096.

Udział procesu wzrostu i różnicowania tkanki tłuszczowej w rozwoju otyłości, zaburzeń metabolicznych i przebudowie tkanki tłuszczowej jest zjawiskiem intensywnie badanym także ze względów cywilizacyjnych. Otyłość i jej powikłania są zaliczane do chorób cywilizacyjnych i są czynnikami obniżającymi jakość i długość życia ludzi. Bezspornie wiadomo, że ze względów podobieństw fizjologicznych, anatomicznych i żywieniowych, jeden z najlepszych modeli zwierzęcych nadających się do badania fizjologii zdrowia i chorób człowieka jest świnia *Sus scrofa* [21]. Wychodząc naprzeciw takim potrzebom i zainteresowaniom, badania nad rolą neuropeptydu B w adipogenezie przeprowadziłam z zastosowaniem komórek świni rasy złotnickiej. Komórki pobierano od młodych prosiąt (około tygodnia życia, 7-10 kg masy ciała), kierując się także dynamiką przyrostu masy ciała i zmianom w obrębie tkanki tłuszczowej u tego gatunku organizmu, chcąc pozyskać jak najwięcej komórek prekursorowych potrzebnych do założenia dobrej jakości eksperymentalnej hodowli pierwotnej. Plan eksperymentalny realizujący cele badawcze, był analogiczny do doświadczeń przeprowadzonych na komórkach szczura i myszy, i obejmował analizę (i) ekspresji neuropeptydu B i receptorów NPBWR1 i NPBWR2, (ii) proliferacji, (iii) ekspresji markerów adipogenezy na poziomie mRNA i białka, (iv) ocenę stopnia zróżnicowania wyrażoną akumulacją triglicerydów (pośrednio lipogeneza) oraz (v) zbadanie ścieżki sygnałowej transmitującej sygnał od receptora po związaniu NPB w badanych adipocytach świni.

W publikacji 5, przedstawiono wyniki badań, na podstawie których sformułowano następujące wnioski:

- neuropeptyd B ulega ekspresji w różnicujących się komórkach WAT świni (potwierdzona ekspresja mRNA i peptydu);
- oba receptory NPBWR1 i NPBWR2 są obecne w trakcie adipogenezy (potwierdzono ekspresja mRNA i białka); Poziom białka obu receptorów spada w trakcie adipogenezy (zaobserwowano zmniejszoną ilość w 6 dniu w porównaniu do pierwszego);
- neuropeptyd B zwiększa proliferację preadipocytów świni (badania potwierdzone w 24- i 48-godzinnej hodowli);

- neuropeptyd B stymuluje ekspresję markerów adipogenezy (C/ebp $\beta$ , C/ebp $\alpha$  i Ppar $\gamma$ ) na wczesnym etapie tego procesu (wzrost ekspresji markerów w pierwszym dniu hodowli różnicującej, brak wpływu w dniu 6);
- promowanie adipogenezy pod wpływem działania neuropeptydu B uwidoczniło się także w zakresie obserwowanego wzrostu akumulacji triglicerydów w powstających w trakcie adipogenezy kroplach tłuszczowych;
- w adipocytach WAT świni sygnał dokomórkowy neuropeptydu B uruchamia ścieżkę wewnątrzkomórkową z udziałem aktywującej fosforylacji kinazy p38, bez udziału kinazy ERK1/2; zastosowanie specyficznego farmakologicznego inhibitora kinazy p38 znosiło efekty stymulacji proliferacji, wzrostu ekspresji mRNA C/ebp $\beta$  i Ppar $\gamma$ , co potwierdza udział p38 w transdukcji sygnału NPB w badanych komórkach.

Podsumowując, neuropeptyd B promuje adipogenezę komórek białej tkanki tłuszczowej świni, podobnie jak komórek WAT i BAT szczura oraz komórek 3T3-L1 WAT myszy. Uwidoczniły się pewne różnice gatunkowo specyficzne, tj. neuropeptyd B stymuluje proliferację preadipocytów białej tkanki tłuszczowej świni, podczas gdy, u gryzoni obserwowano jedynie wzrost proliferacji preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej przy braku wpływu na wzrost preadipocytów WAT. Można sądzić, że różnice gatunkowe w obecności brunatnej tkanki tłuszczowej przez całe życie osobnicze (od urodzenia i stale w dorosłości u gryzoni) lub jej braku (świnie) są przyczyną odmiennych obserwacji w proliferacji po ekspozycji komórek na neuropeptyd B. Mimo pewnych różnic, **neuropeptyd B w warunkach *in vitro* zwiększa proces adipogenezy**, a kompleksowa jego rola w procesie powstawania i metabolizmie tkanki tłuszczowej typu białego i brunatnego wymaga uwzględnienia złożoności organizmu *in vivo*.

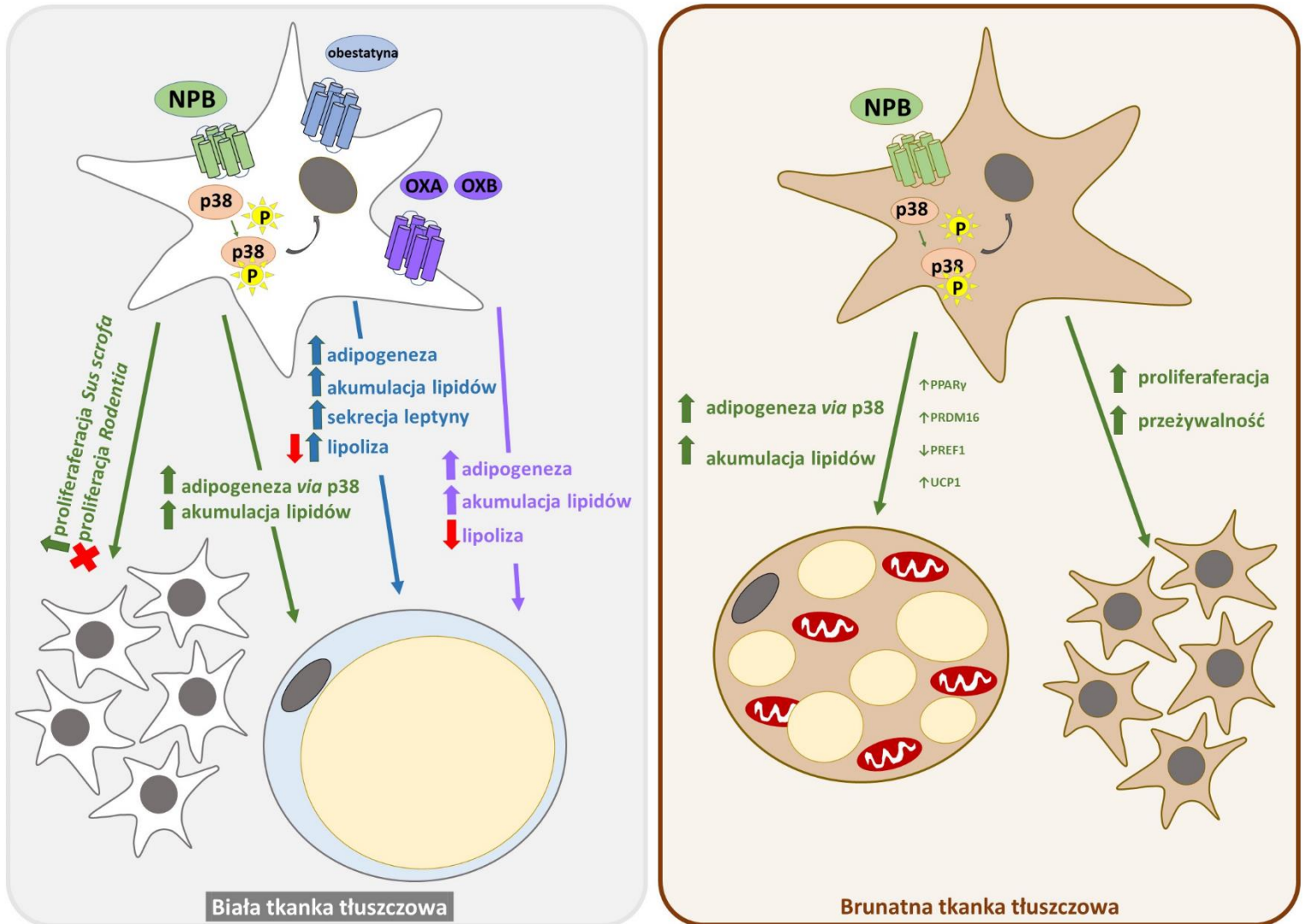
**W ramach dokonania habilitacyjnego wykazano:**

- ekspresję mRNA oraz białka receptora/ów i neuropeptydu B w różnicowanych *in vitro* białych preadipocytach szczura i świni oraz w brunatnych preadipocytach szczura. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość działania neuropeptydu B na preadipocyty w trakcie adipogenezy drogą para- czy autokrynną, nie wykluczając drogi neuroendokrynej;
- NPB stymuluje różnicowanie, szczególnie w początkowym etapie adipogenezy, białych preadipocytów szczura i świni oraz brunatnych preadipocytów szczura – zwiększa akumulację lipidów w trakcie różnicowania oraz ekspresję genów markerowych odpowiedzialnych za adipogenezę na poziomie mRNA i białka;
- neuropeptyd B wywiera efekty biologiczne na białe i brunatne adipocyty szczura oraz białe adipocyty świni poprzez szlak wewnątrzkomórkowy w którym bierze udział kinaza p38 – potwierdzono udział tego szlaku z użyciem specyficznego inhibitora kinazy p38 SB239063;
- NPB stymuluje proliferację brunatnych komórek tłuszczowych szczura, jednak nie wpływa na wzrost preadipocytów białych izolowanych z tkanki okołojądrowej szczura;
- NPB stymuluje proliferację białych preadipocytów świni.

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie prac, stanowiących osiągnięcie habilitacyjne, stanowią załącznik nr 5.

## Podsumowanie i wnioski

Rycina przedstawia zebrane efekty działania obestatyny, oreksyny A i B oraz neuropeptydu B na adipogenezę komórek tkanki tłuszczowej wykazane w ramach prezentowanego osiągnięcia:



Prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego były finansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu **OPUS 2016/21/B/NZ9/00943**: „Rola neuropeptydu B w regulacji funkcji preadipocytów szczura i świni” (2017-2021)– **praca 3, 4 i 5**) oraz projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych **N N303 3193 37**: „Rola obestatyny w regulacji metabolizmu adipocytów białej tkanki tłuszczowej szczura” (2009-2012) – **praca 1**), którymi kierowałam. Ponadto, **praca 2** powstała w ramach realizacji projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych **N N311 5083 39**: „Rola oreksyn w hormonalnej regulacji metabolizmu energetycznego przez oś adipoinsularną świni” (2010-2013), którego byłam wykonawcą.

**Literatura**

1. Cuthbertson, D.P.; Tompsett, S.L. The Degree of Unsaturation of the Fats of Human Adipose Tissue in Relation to Depth from Skin Surface. *Biochem J* **1933**, *27*, 1103–1106, doi:10.1042/bj0271103.
2. Townsend, K.L.; Tseng, Y.-H. Of Mice and Men: Novel Insights Regarding Constitutive and Recrutable Brown Adipocytes. *Int J Obes Suppl* **2015**, *5*, S15–S20, doi:10.1038/ijosup.2015.5.
3. Giordano, A.; Smorlesi, A.; Frontini, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of the Adipose Organ. *Eur J Endocrinol* **2014**, *170*, R159–R171, doi:10.1530/EJE-13-0945.
4. Mulya, A.; Kirwan, J.P. Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am* **2016**, *45*, 605–621, doi:10.1016/j.ecl.2016.04.010.
5. Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue. *Nature* **1994**, *372*, 425–432, doi:10.1038/372425a0.
6. Seeley, R.; van Dijk, G.; Campfield, L.; Smith, F.; Burn, P.; Nelligan, J.; Bell, S.; Baskin, D.; Woods, S.; Schwartz, M. Intraventricular Leptin Reduces Food Intake and Body Weight of Lean Rats but Not Obese Zucker Rats. *Hormone and Metabolic Research* **1996**, *28*, 664–668, doi:10.1055/s-2007-979874.
7. Klok, M.D.; Jakobsdottir, S.; Drent, M.L. The Role of Leptin and Ghrelin in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans: A Review. *Obesity Reviews* **2007**, *8*, 21–34, doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x.
8. Zhou, Y.; Rui, L. Leptin Signaling and Leptin Resistance. *Front Med* **2013**, *7*, 207–222, doi:10.1007/s11684-013-0263-5.
9. Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26746–26749, doi:10.1074/jbc.270.45.26746.
10. Steppan, C.M.; Bailey, S.T.; Bhat, S.; Brown, E.J.; Banerjee, R.R.; Wright, C.M.; Patel, H.R.; Ahima, R.S.; Lazar, M.A. The Hormone Resistin Links Obesity to Diabetes. *Nature* **2001**, *409*, 307–312, doi:10.1038/35053000.
11. Hug, C.; Lodish, H.F. Medicine. Visfatin: A New Adipokine. *Science* **2005**, *307*, 366–367, doi:10.1126/science.1106933.
12. Kershaw, E.E.; Flier, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, *89*, 2548–2556, doi:10.1210/jc.2004-0395.
13. Oussaada, S.M.; van Galen, K.A.; Coومان, M.I.; Kleinendorst, L.; Hazebroek, E.J.; van Haelst, M.M.; ter Horst, K.W.; Serlie, M.J. The Pathogenesis of Obesity. *Metabolism* **2019**, *92*, 26–36, doi:10.1016/j.metabol.2018.12.012.
14. GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M.; SUL, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* **1998**, *78*, 783–809, doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783.
15. Moseti, D.; Regassa, A.; Kim, W.-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, 124, doi:10.3390/ijms17010124.



16. Lefterova, M.I.; Lazar, M.A. New Developments in Adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2009**, *20*, 107–114, doi:10.1016/j.tem.2008.11.005.
17. Aratani, Y.; Kitagawa, Y. Enhanced Synthesis and Secretion of Type IV Collagen and Entactin during Adipose Conversion of 3T3-L1 Cells and Production of Unorthodox Laminin Complex. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 16163–16169.
18. Paulauskis, J.D.; Sul, H.S. Cloning and Expression of Mouse Fatty Acid Synthase and Other Specific MRNAs. Developmental and Hormonal Regulation in 3T3-L1 Cells. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 7049–7054.
19. Bäck, K.; Arnqvist, H.J. Changes in Insulin and IGF-I Receptor Expression during Differentiation of Human Preadipocytes. *Growth Hormone & IGF Research* **2009**, *19*, 101–111, doi:10.1016/j.ghir.2008.06.004.
20. Enriori, P.J.; Evans, A.E.; Sinnayah, P.; Cowley, M.A. Leptin Resistance and Obesity. *Obesity* **2006**, *14*, 254S–258S, doi:10.1038/oby.2006.319.
21. Walters, E.M.; Prather, R.S. Advancing Swine Models for Human Health and Diseases. *Mo Med* **2013**, *110*, 212–215.
22. Zhang, J. V.; Ren, P.-G.; Avsian-Kretchmer, O.; Luo, C.-W.; Rauch, R.; Klein, C.; Hsueh, A.J.W. Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science (1979)* **2005**, *310*, 996–999, doi:10.1126/science.1117255.
23. Lacquaniti, A.; Donato, V.; Chirico, V.; Buemi, A.; Buemi, M. Obestatin: An Interesting but Controversial Gut Hormone. *Ann Nutr Metab* **2011**, *59*, 193–199, doi:10.1159/000334106.
24. Villarreal, D.; Pradhan, G.; Zhou, Y.; Xue, B.; Sun, Y. Diverse and Complementary Effects of Ghrelin and Obestatin. *Biomolecules* **2022**, *12*, 517, doi:10.3390/biom12040517.
25. Tong, J.; Prigeon, R.L.; Davis, H. W.; Bidlingmaier, M.; Kahn, S.E.; Cummings, D.E.; Tschöp, M.H.; D'Alessio, D. Ghrelin Suppresses Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Deteriorates Glucose Tolerance in Healthy Humans. *Diabetes* **2010**, *59*, 2145–2151, doi:10.2337/db10-0504.
26. Yada, T.; Damdindorj, B.; Rita, R.S.; Kurashina, T.; Ando, A.; Taguchi, M.; Koizumi, M.; Sone, H.; Nakata, M.; Kakei, M.; et al. Ghrelin Signalling in  $\beta$ -Cells Regulates Insulin Secretion and Blood Glucose. *Diabetes Obes Metab* **2014**, *16*, 111–117, doi:10.1111/dom.12344.
27. Dezaki, K.; Sone, H.; Koizumi, M.; Nakata, M.; Kakei, M.; Nagai, H.; Hosoda, H.; Kangawa, K.; Yada, T. Blockade of Pancreatic Islet-Derived Ghrelin Enhances Insulin Secretion to Prevent High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* **2006**, *55*, 3486–3493, doi:10.2337/db06-0878.
28. Pradhan, G.; Wu, C.-S.; Han Lee, J.; Kanikarla, P.; Guo, S.; Yechoor, V.K.; Samson, S.L.; Sun, Y. Obestatin Stimulates Glucose-Induced Insulin Secretion through Ghrelin Receptor GHS-R. *Sci Rep* **2017**, *7*, 979, doi:10.1038/s41598-017-00888-0.
29. Zhang, J. V.; Jahr, H.; Luo, C.-W.; Klein, C.; Van Kolen, K.; Ver Donck, L.; De, A.; Baart, E.; Li, J.; Moechars, D.; et al. Obestatin Induction of Early-Response Gene Expression in Gastrointestinal and Adipose Tissues and the Mediator Role of G Protein-Coupled Receptor, GPR39. *Mol Endocrinol* **2008**, *22*, 1464–1475, doi:10.1210/me.2007-0569.
30. Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rotellar, F.; Silva, C.; Gil, M.J.; Rodríguez, A.; Cienfuegos, J.A.; Salvador, J.; Frühbeck, G. The Obestatin Receptor (GPR39) Is Expressed in Human

- Adipose Tissue and Is down-Regulated in Obesity-Associated Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2007**, *66*, 598–601, doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02777.x.
31. Gurriarán-Rodríguez, U.; Al-Massadi, O.; Roca-Rivada, A.; Crujeiras, A.B.; Gallego, R.; Pardo, M.; Seoane, L.M.; Pazos, Y.; Casanueva, F.F.; Camiña, J.P. Obestatin as a Regulator of Adipocyte Metabolism and Adipogenesis. *J Cell Mol Med* **2011**, *15*, 1927–1940, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01192.x.
  32. Miegueu, P.; St Pierre, D.; Broglio, F.; Cianflone, K. Effect of Desacyl Ghrelin, Obestatin and Related Peptides on Triglyceride Storage, Metabolism and GHSR Signaling in 3T3-L1 Adipocytes. *J Cell Biochem* **2011**, *112*, 704–714, doi:10.1002/jcb.22983.
  33. Pruszyńska-Oszmerek, E.; Szczepankiewicz, D.; Hertig, I.; Skrzypski, M.; Sassek, M.; Kaczmarek, P.; Kolodziejski, P.A.; Mackowiak, P.; Nowak, K.W.; Strowski, M.Z.; et al. Obestatin Inhibits Lipogenesis and Glucose Uptake in Isolated Primary Rat Adipocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* **2013**, *27*, 23–33.
  34. WOJCIECHOWICZ, T.; SKRZYPSKI, M.; KOŁODZIEJSKI, P.A.; SZCZEPANKIEWICZ, D.; PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK, E.; KACZMAREK, P.; STROWSKI, M.Z.; NOWAK, K.W. Obestatin Stimulates Differentiation and Regulates Lipolysis and Leptin Secretion in Rat Preadipocytes. *Mol Med Rep* **2015**, *12*, 8169–8175, doi:10.3892/mmr.2015.4470.
  35. Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R.M.; Tanaka, H.; Williams, S.C.; Richardson, J.A.; Kozlowski, G.P.; Wilson, S.; et al. Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior. *Cell* **1998**, *92*, 573–585, doi:10.1016/s0092-8674(00)80949-6.
  36. de Lecea, L.; Kilduff, T.S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P.E.; Danielson, P.E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E.L.; Gautvik, V.T.; Bartlett, F.S.; et al. The Hypocretins: Hypothalamus-Specific Peptides with Neuroexcitatory Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 322–327, doi:10.1073/pnas.95.1.322.
  37. Wang, J.; Osaka, T.; Inoue, S. Energy Expenditure by Intracerebroventricular Administration of Orexin to Anesthetized Rats. *Neurosci Lett* **2001**, *315*, 49–52, doi:10.1016/s0304-3940(01)02322-9.
  38. Sakurai, T. The Role of Orexin in Motivated Behaviours. *Nat Rev Neurosci* **2014**, *15*, 719–731, doi:10.1038/nrn3837.
  39. Chemelli, R.M.; Willie, J.T.; Sinton, C.M.; Elmquist, J.K.; Scammell, T.; Lee, C.; Richardson, J.A.; Williams, S.C.; Xiong, Y.; Kisanuki, Y.; et al. Narcolepsy in Orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation. *Cell* **1999**, *98*, 437–451, doi:10.1016/s0092-8674(00)81973-x.
  40. Malendowicz, L.K.; Jedrzejczak, N.; Belloni, A.S.; Trejter, M.; Hochól, A.; Nussdorfer, G.G. Effects of Orexins A and B on the Secretory and Proliferative Activity of Immature and Regenerating Rat Adrenal Glands. *Histol Histopathol* **2001**, *16*, 713–717, doi:10.14670/HH-16.713.
  41. Göncz, E.; Strowski, M.Z.; Grötzing, C.; Nowak, K.W.; Kaczmarek, P.; Sassek, M.; Mergler, S.; El-Zayat, B.F.; Theodoropoulou, M.; Stalla, G.K.; et al. Orexin-A Inhibits Glucagon Secretion and Gene Expression through a Foxo1-Dependent Pathway. *Endocrinology* **2008**, *149*, 1618–1626, doi:10.1210/en.2007-1257.



42. Nowak, K.W.; Maćkowiak, P.; Switońska, M.M.; Fabiś, M.; Malendowicz, L.K. Acute Orexin Effects on Insulin Secretion in the Rat: In Vivo and in Vitro Studies. *Life Sci* **2000**, *66*, 449–454, doi:10.1016/s0024-3205(99)00611-6.
43. Digby, J.E.; Chen, J.; Tang, J.Y.; Lehnert, H.; Matthews, R.N.; Randeve, H.S. Orexin Receptor Expression in Human Adipose Tissue: Effects of Orexin-A and Orexin-B. *J Endocrinol* **2006**, *191*, 129–136, doi:10.1677/joe.1.06886.
44. Skrzypski, M.; T Le, T.; Kaczmarek, P.; Pruszyńska-Oszmerek, E.; Pietrzak, P.; Szczepankiewicz, D.; Kolodziejcki, P.A.; Sassek, M.; Arafat, A.; Wiedenmann, B.; et al. Orexin A Stimulates Glucose Uptake, Lipid Accumulation and Adiponectin Secretion from 3T3-L1 Adipocytes and Isolated Primary Rat Adipocytes. *Diabetologia* **2011**, *54*, 1841–1852, doi:10.1007/s00125-011-2152-2.
45. Skrzypski, M.; Kaczmarek, P.; Le, T.T.; Wojciechowicz, T.; Pruszyńska-Oszmerek, E.; Szczepankiewicz, D.; Sassek, M.; Arafat, A.; Wiedenmann, B.; Nowak, K.W.; et al. Effects of Orexin A on Proliferation, Survival, Apoptosis and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes. *FEBS Lett* **2012**, *586*, 4157–4164, doi:10.1016/j.febslet.2012.10.013.
46. Zwirska-Korczala, K.; Adamczyk-Sowa, M.; Sowa, P.; Pilc, K.; Suchanek, R.; Pierzchala, K.; Namyslowski, G.; Misiolek, M.; Sodowski, K.; Kato, I.; et al. Role of Leptin, Ghrelin, Angiotensin II and Orexins in 3T3 L1 Preadipocyte Cells Proliferation and Oxidative Metabolism. *J Physiol Pharmacol* **2007**, *58 Suppl 1*, 53–64.
47. Fujii, R.; Yoshida, H.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Hosoya, M.; Kawamata, Y.; Yano, T.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Asami, T.; et al. Identification of a Neuropeptide Modified with Bromine as an Endogenous Ligand for GPR7. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 34010–34016, doi:10.1074/jbc.M205883200.
48. Tanaka, H.; Yoshida, T.; Miyamoto, N.; Motoike, T.; Kurosu, H.; Shibata, K.; Yamanaka, A.; Williams, S.C.; Richardson, J.A.; Tsujino, N.; et al. Characterization of a Family of Endogenous Neuropeptide Ligands for the G Protein-Coupled Receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 6251–6256, doi:10.1073/pnas.0837789100.
49. Wojciechowicz, T.; Billert, M.; Jasaszwilli, M.; Strowski, M.Z.; Nowak, K.W.; Skrzypski, M. The Role of Neuropeptide B and Its Receptors in Controlling Appetite, Metabolism, and Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6632, doi:10.3390/ijms22126632.
50. Ishii, M.; Fei, H.; Friedman, J.M. Targeted Disruption of GPR7, the Endogenous Receptor for Neuropeptides B and W, Leads to Metabolic Defects and Adult-Onset Obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 10540–10545, doi:10.1073/pnas.1334189100.
51. Hudak, C.S.; Sul, H.S. Pref-1, a Gatekeeper of Adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2013**, *4*, doi:10.3389/fendo.2013.00079.
52. Engelman, J.A.; Lisanti, M.P.; Scherer, P.E. Specific Inhibitors of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Block 3T3-L1 Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 32111–32120, doi:10.1074/jbc.273.48.32111.
53. Bost, F.; Aouadi, M.; Caron, L.; Binétruy, B. The Role of MAPKs in Adipocyte Differentiation and Obesity. *Biochimie* **2005**, *87*, 51–56, doi:10.1016/j.biochi.2004.10.018.
54. Kelly, M.A.; Beuckmann, C.T.; Williams, S.C.; Sinton, C.M.; Motoike, T.; Richardson, J.A.; Hammer, R.E.; Garry, M.G.; Yanagisawa, M. Neuropeptide B-Deficient Mice Demonstrate Hyperalgesia in Response to Inflammatory Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 9942–9947, doi:10.1073/pnas.0503795102.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

### 5.1 Główne nurty badawcze poza osiągnięciem habilitacyjnym

W ramach działalności naukowej wykraczającej poza osiągnięcie habilitacyjne, prowadziłam oraz uczestniczyłam w prowadzeniu badań dotyczących regulacji endokrynych w osi adipoinsubularnej. Mechanizmy regulacji wydzielania insuliny i glukagonu, funkcjonowania endokrynych wysp trzustkowych oraz ich relacje z zasobami energetycznymi organizmu w postaci pokładów tkanki tłuszczowej WAT i BAT, które również są narządem o funkcji endokrynej, stanowią w końcowym efekcie o utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu w warunkach fizjologicznych oraz zaburzeń takich jak cukrzyca i otyłość. Całościowy dorobek naukowy poza osiągnięciem habilitacyjnym jest zebrany w formie wykazu dorobku publikacyjnego przedstawionego w załączniku 4. Poniżej przedstawiam, podzielone na logiczne obszary, główne nurty badawcze nie wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

#### Regulacja funkcji komórek endokrynych i neuroendokrynych wysp trzustki

Badania były prowadzone w układach eksperymentów *iv vitro* na komórkach ustalonej linii komórkowej insulinosekrecyjnej INS-1E oraz na świeżo izolowanych wyspach trzustkowych szczura. Eksperymenty dotyczyły wpływu neuromedyny U, neuropeptydu B, oreksyny A i feniksyny na wybrane aspekty metabolizmu komórek  $\beta$ . Ponadto, analizowaliśmy działanie egzogenego czynnika będącego ostrym składnikiem papryczek *chili* – kapsaicyny na przeżywalność komórek neuroendokrynych nowotworowych trzustki linii QGP oraz BON. Efekty działania cerebeliny (CER) na sekrecję insuliny badaliśmy w układach *in vivo* oraz *in vitro*. Wynikiem współudziału w prowadzonych badaniach są następujące wnioski :

- wykazanie ekspresji mRNA neuropeptydu B i receptora NPBW1 w komórkach INS-1E i wyspach trzustki szczura; stwierdzenie, że neuropeptyd B zwiększa ekspresję mRNA insuliny poprzez mechanizm zależny od kinazy ERK1/2 w komórkach INS-1E; potwierdzenie stymulującego działania NPB na wydzielanie insuliny z komórek INS-1E oraz z wysp trzustki szczura; wykazanie, że NPB nie wpływa na wzrost lub śmierć komórek INS-1E; na podstawie badań

- wywnioskowano, że NPB może regulować wydzielanie i ekspresję insuliny w komórkach INS-1E oraz wydzielanie insuliny przez wyspy trzustkowe szczura;
- potwierdzenie udziału kanałów TRPV4 i TRPV6 w ekspresji oraz wydzielaniu insuliny, proliferacji i apoptozy w komórkach INS-1E; wykazanie, że kanały TRPV4 są zaangażowane w ekspresję mRNA insuliny oraz śmierć komórek INS-1E ścieżką wewnątrzkomórkową z udziałem kinazy ERK1/2 oraz tlenku azotu (NO) jako wtórnego przekaźnika;
  - wykazanie, że oreksyna A jest czynnikiem modulującym proliferację oraz wydzielanie insuliny (badania na insulinosekrecyjnych komórkach INS-1E); oreksyna A zwiększa proliferację komórek INS-1E poprzez mechanizm wewnątrzkomórkowej aktywacji kinazy ERK1/2; w stymulacji sekrecji insuliny z komórek INS-1E pod wpływem oreksyny A uczestniczą kanały TRP oraz ma to związek z wewnątrzkomórkowym wzrostem stężenia jonów wapnia;
  - zainteresowanie kapsaicyną (CAP), ostrym składnikiem papryczek chili, wynikało z udokumentowanych wcześniej doniesień pokazujących jej hamujące działanie na wzrost różnych litych nowotworów; podjęto badania na modelu komórek BON oraz QGP - komórki neuroendokrynych nowotworów trzustki szczura; kapsaicyna jest agonistą głównie receptora TRPV1, ulegającego ekspresji w komórkach linii BON i QGP; w wyniku podjętych we współpracy badań wykazano, że kapsaicyna indukuje cytotoksyczność poprzez zaburzenie potencjału mitochondrialnego i hamuje syntezę ATP w komórkach QGP i BON; stymulacja wytwarzania reaktywnych form tlenu (ang. ROS) przez kapsaicynę wydaje się być efektem wtórnym, niezwiązanym z cytotoksycznością indukowaną przez ten czynnik;
  - neuromedyna U (NmU) obniża sekrecję insuliny przez izolowane wyspy szczura w sposób dawko-zależny, a efekt ten odbywa się poprzez receptor NmUR1, którego ekspresję potwierdzono w wyspach trzustki; neuromedyna U obniża wydzielanie insuliny w modelu perfundowanej trzustki *in situ*, ponadto NmU stymuluje sekrecję somatostatyny z izolowanych wysp trzustki; zablokowanie działania somatostatyny znosi hamujący wpływ NmU na wydzielanie insuliny;
  - w badaniach *in vivo* stwierdzono, że cerebelina obniżała poziom insuliny w osoczu u szczurów po 1 i 2 godzinach; w badaniach *in vitro*, cerebelina zmniejszała wydzielanie insuliny z izolowanych wysepek trzustkowych szczura przy wysokim (11 mM), ale nie przy niskim (3,33 mM) stężeniu glukozy; ponadto,

zidentyfikowano cerebelinę jako czynnik insulinostatyczny, który zmniejsza wewnątrzkomórkową produkcję cAMP i wapnia w komórkach INS-1; potwierdzono, że transkrypty isoform cerebeliny, Cbln1 i Cbln3, ulegają ekspresji w trzustce wewnątrzwydzielniczej szczura.

### **Metabolizm, adipogeneza i funkcja endokrynną komórek tkanki tłuszczowej**

Współpraca wewnątrz- i między-zespołowa z innymi pracownikami Katedry w obszarze tematyki związanej z adipogenezą oraz funkcjonowaniem tkanki tłuszczowej obejmowała także badania roli innych związków biologicznie aktywnych endogennych, między innymi, oreksyny, neuronostatyny (NST), feniksyny (PNX) i adropiny, a ponadto egzogenne białko  $\gamma$ -konglutyny (białko z nasion łubinu) w adipogenezie i/lub wzroście i/lub metabolizmie komórek tkanki tłuszczowej białej i/lub brunatnej.

Do najważniejszych wniosków z tych badań należą:

- wykazanie mechanizmu stymulującego proliferację i przeżywalność preadipocytów linii 3T3-L1, a ponadto ochronę komórek przed apoptozą (poprzez aktywację ścieżki z udziałem kinazy ERK1/2) pod wpływem oreksyny A;
- potwierdzenie ekspresji receptora obestatyny w izolowanych szczurzych komórkach białej tkanki tłuszczowej, a poprzez ten receptor obestatyna hamuje podstawową oraz stymulowaną insuliną lipogenezę i dokomórkowy transport glukozy przy jednoczesnym wzmaganiu stymulowanej adrenaliną lipolizy – obestatyna jest peptydem regulującym metabolizm adipocytów WAT;
- wykazanie, że feniksyna (PNX) stymuluje różnicowanie preadipocytów linii 3T3-L1 oraz preadipocytów szczura w dojrzałe adipocyty poprzez szlak wewnątrzkomórkowej ścieżki zależnej od cAMP/Epac: feniksyna promuje adipogenezę komórek białej tkanki tłuszczowej, przez co może być zaangażowana w kontrolę regulacji masy ciała;
- udokumentowanie stymulującego działania adropiny na proliferację preadipocytów 3T3-L1 poprzez aktywację ścieżek z udziałem kinaz ERK1/2 i AKT; wykazanie, że adropina osłabia różnicowanie preadipocytów w dojrzałe komórki tłuszczowe - peptyd zmniejszał akumulację lipidów, jak również ekspresję genów proadipogennych w komórkach 3T3-L1 i preadipocytach białej tkanki tłuszczowej szczura;

- wskazanie, że adropina może być zaangażowana w kontrolowanie metabolizmu lipidów i ekspresję adipokin w adipocytach białej tkanki tłuszczowej gryzoni: adropina nieznacznie promuje lipolizę w izolowanych adipocytach szczura i różnicowanych adipocytach 3T3-L1; adropina hamuje lipogenezę w izolowanych dojrzałych adipocytach szczura bez wpływu na wychwyt glukozy; ponadto adropina stymuluje ekspresję mRNA adiponektyny oraz hamuje ekspresję rezystyny i wisfatyny;
- przedstawienie, że adropina stymuluje proliferację preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej szczura i hamuje ich różnicowanie w dojrzałe adipocyty: adropina stymuluje proliferację preadipocytów BAT, hamuje ekspresję mRNA genów adipogennych podczas procesu różnicowania oraz hamuje produkcję białka UCPI w adipocytach BAT i zmniejsza zawartość lipidów zgromadzonych w brązowych adipocytach;
- wykazanie, że neuronostatyna, zależnie od kinazy AKT, stymuluje proliferację preadipocytów WAT szczura i 3T3-L1 poprzez receptor GPR107, natomiast peptyd ten hamuje różnicowanie preadipocytów w dojrzałe adipocyty – zmniejsza ekspresję transkryptów markerowych adipogenezy oraz akumulację lipidów w komórkach;
- biorąc pod uwagę poznany wcześniej pozytywny efekt działania białka z nasion łubinu,  $\gamma$ -konglutyny, na homeostazę lipidów i glukozy poprzez interakcję z tkankami obwodowymi, takimi jak mięśnie, wątroba czy trzustka oraz fakt, że tkanka tłuszczowa bierze udział w kontrolowaniu metabolizmu glukozy i lipidów, w ramach międzywydziałowej współpracy postanowiliśmy zbadać wpływ izolowanej  $\gamma$ -konglutyny na homeostazę poprzez interakcję z adipocytami, w tym tworzenie tkanki tłuszczowej; wykazaliśmy, że  $\gamma$ -konglutyna nie ma wpływu na żywotność i proliferację preadipocytów 3T3-L1 natomiast  $\gamma$ -konglutyna hamowała ekspresję markerów adipogennych a preadipocyty 3T3-L1 różnicowane z  $\gamma$ -konglutyną wykazywały zmniejszoną zawartość lipidów -  $\gamma$ -konglutyna hamuje różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 w dojrzałe komórki tłuszczowe.

**Egzo- i endogenne modulatory wpływające na metabolizm w cukrzycy**

Ważnym obszarem badawczym mojej pracy było określenie roli wybranych czynników biologicznie aktywnych mających związek z regulacją masy ciała i utrzymaniem homeostazy energetycznej organizmu pochodzenia endogennego (glukagon, adropina) oraz egzogenego (resweratrol) w stanie patofizjologicznym jakim jest cukrzyca. Do najważniejszych wniosków uzyskanych na podstawie przeprowadzonych wspólnie badań należą :

- wskazanie, że czynnik wzrostu fibroblastów 21 (FGF21) jest zaangażowany w stymulację lipolizy indukowanej przez glukagon – badania potwierdziły efekt u zdrowych pacjentów oraz pacjentów z cukrzycą typu 1; ponadto efekt wykazano także w doświadczeniach *in vivo* na szczurach zdrowych oraz w indukowanej streptozotocyną cukrzycy typu 2;
- wykazanie, że oreksyna A poprawia kontrolę glukozy, zwiększając wrażliwość na insulinę i chroniąc komórki  $\beta$  przed apoptotyczną śmiercią komórek u zwierząt z cukrzycą typu 2 (doświadczenia przeprowadzono na izolowanych wyspach pobranych od zwierząt z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą typu 2 przez podanie streptozotocyny i wysokotłuszczowej paszy); oreksyna A obniżyła poziom czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) w osoczu u szczurów z cukrzycą typu 2; oreksyna A zmniejszała apoptozę indukowaną palmitynianem i TNF- $\alpha$  komórek INS-1E;
- potwierdzenie, że traktowanie szczurów Goto-Kakizaki (GK) i kontrolnych Sprague-Dawley (SD) dożołądkowo resweratrolem (20 mg/kg masy ciała/dzień) przez 10 tygodni, poprawiało tolerancję glukozy i zapobiegało gromadzeniu się lipidów w mięśniach szkieletowych; zaobserwowano, że efekt ten jest związany ze znaczną normalizacją ekspresji i fosforylacji karboksylazy acetylo-CoA (ACC) i kinazy białkowej B (AKT) w mięśniach szkieletowych; u szczurów GK poddanych terapii resweratrolem wyraźnie poprawiła się również struktura wysp trzustkowych, a ponadto poziomy adiponektyny i leptyny we krwi zostały częściowo znormalizowane; wykazano, że resweratrol łagodzi kluczowe objawy cukrzycy u szczurów rasy GK oraz poprawia tolerancję glukozy, pozytywnie wpływa na wysepki trzustkowe.



### **Regulacja i charakterystyka procesu diapauzy u samic murarki ogrodowej *Osmia bicornis***

Współpraca z naukowcami z Katedry Zoologii macierzystego Uniwersytetu dotyczyła fizjologicznych aspektów zimowania zwierząt bezkręgowych. Badania poświęcone były fizjologicznej charakterystyce i różnym aspektom regulacji diapauzy imaginalnej występującej obligatoryjnie u pszczoły samotniczej *Osmia bicornis* L. Prowadzone badania pozwoliły na precyzyjne ustalenie czasu trwania poszczególnych okresów diapauzy, roli jaką pełni w tym procesie hormon juwenilny oraz mechanizmów kontrolujących wykorzystanie rezerw energetycznych podczas diapauzy.

Efektom badań w których uczestniczyłam są następujące wnioski:

- wykazanie po raz pierwszy zmian w morfologii jajnika oraz koncentracji białka w jajnikach i ciele tłuszczowym, które towarzyszą poszczególnym okresom rozwojowym murarki od momentu pojawienia się imago w kokonie do momentu wygryzienia; wykorzystanie zaproponowanych przez nas wskaźników fizjologicznych (tempo rozwoju jajnika, koncentracja białka) pozwala na bardzo precyzyjne określenie stadium rozwojowego murarki;
- wskazanie na silną relację między hormonem juwenilnym a temperaturą i ich rolę jako czynników regulujących diapauzę u *Osmia bicornis*; naszą interpretację odnośnie nadrzędnej roli JH jako czynnika regulującego proces diapauzy potwierdzają wcześniejsze badania nad rolą temperatury jako czynnika przerywającego zimowanie u pszczół;
- biorąc pod uwagę, że odpowiednie dysponowanie zasobami energetycznymi odgrywa bardzo ważną rolę podczas diapauzy, kiedy to dostępność pokarmu jest silnie ograniczona, w naszej pracy skupiliśmy się na zmianach koncentracji trzech grup związków: lipidów, cukrów oraz białek a przeprowadzona kompleksowa ocena zarządzania rezerwami metabolicznymi podczas zimowania i roli jaką pełni osł jelito – ciało tłuszczowe – hemolimfa co pozwoliło stwierdzić, że w jelicie środkowym lipidy były zużywane głównie w okresie przedzimowym (wrzesień–październik); a w ciele tłuszczowym i hemolimfie uruchomione zostały zapasy lipidów i węglowodanów; w jelicie środkowym i końcowym mobilizacja węglowodanów zachodziła zarówno na początku, jak i na końcu okresu zimowania; aktywność enzymów (proteaz i amylaz) jelita środkowego zmieniała się istotnie w okresie zimowania: o ile aktywność proteazy jelita środkowego była stosunkowo niska na początku okresu zimowania (wrzesień), o tyle jej aktywność znacznie wzrosła w końcowej fazie zimowania, w okresie postdiapauzy (luty–marzec), z drugiej strony

aktywność amylazy wykazywała wysoką aktywność w okresie spoczynku przed zimowaniem i podiapauzie, natomiast jej aktywność była niska w okresie głębokiej diapauzy (grudzień-styczeń); w miesiącach zimowych stężenie lipidów w ciele tłuszczowym i hemolimfie oraz wolnych węglowodanów w hemolimfie powoli spadało natomiast z drugiej strony stężenie glikogenu drastycznie spadło po listopadzie i utrzymywało się na bardzo niskim poziomie do lutego, a następnie wzrastało wraz ze wzrostem temperatury otoczenia; badania pokazały, że te dynamiczne strategie fizjologiczne przyjęte przez pszczołę murarkę pozwalają jej pomyślnie zimować;

- biorąc pod uwagę, że do czasu podjęcia wspólnych badań w literaturze nie odnotowano żadnych informacji odnośnie występowania u owadów hormonów peptydowych strukturą zbliżonych do adiponektyny i rezystyny (adipocytokin) kręgowców, przeprowadzone przez nas badania bazujące na specyficznych i czułych testach wykazały jednoznacznie, że w komórkach ciała tłuszczowego diapauzujących imago owadów, mogą być syntetyzowane peptydy o budowie podobnej do adipocytokin ssaków zaangażowane w regulację poziomu wolnych lipidów w hemolimfie;
- uwzględniając zmieniające się warunki klimatu, przeprowadzone wspólnie badania wykazały, że natężenie promieniowania UV-B może mieć wpływ na rozwój murarki ogrodowej: wykazaliśmy, że wzrost natężenia promieniowania UV-B wpływa niekorzystnie na masę ciała i zawartości tkanki tłuszczowej, powoduje liczne deformacje okolic głowy i skrzydeł oraz wyraźnie zwiększa śmiertelność.



Dorobek naukowy udokumentowany publikacjami, który jest efektem współpracy z innymi jednostkami naukowymi poza macierzystą Katedrą Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu przedstawia poniższe zestawienie.

## 5.2 Współpraca naukowa z jednostką zagraniczną

**Współpraca naukowa:** od 2009 roku z Department of Hepatology and Gastroenterology & the Interdisciplinary Centre of Metabolism: Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Charité-University Medicine Berlin Campus Virchow-Klinikum, Niemcy, **prof. Mathias Strowski**  
Staż naukowy w ośrodku: 01-31 sierpień 2018 i 01-31 lipiec 2019

**Forma współpracy:** współpraca naukowa miała na celu przygotowanie oraz prowadzenie wspólnych projektów badawczych i doświadczeń, które zaowocowały publikacjami naukowymi. Badania były prowadzone w obszarze regulacji neuroendokrynych funkcjonowania komórek osi adipoinsubularnej a także badań dotyczących problematyki cukrzycy i otyłości.

### **Efekty współpracy:**

1. Kaczmarek P, Malendowicz LK, Fabis M, Ziolkowska A, Pruszyńska-Oszmałek E, Sassek M, **Wojciechowicz T**, Szczepankiewicz D, Andralojc K, Szkudelski T, Strowski MZ, Nowak KW. Does somatostatin confer insulinostatic effects of neuromedin U in the rat pancreas? *Pancreas* **2009**, 38(2):208-212
2. Strowski MZ, Kaczmarek P, Mergler S, Wiedenmann B, Domin D, Szwejkowski P, **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Szczepankiewicz D, Szkudelski T, Rucinski M, Malendowicz LK, Nowak KW. **Insulinostatic activity of cerebellin - evidence from in vivo and in vitro studies in rats.** *Regulatory Peptides* **2009**, 157(1-3):19-24
3. Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmałek E, Ruciński M, Szczepankiewicz D, Sassek M, **Wojciechowicz T**, Kaczmarek P, Kołodziejcki PA, Strowski MZ, Malendowicz LK, Nowak KW. Neuropeptide B and W regulate leptin and resistin secretion, and stimulate lipolysis in isolated rat adipocytes. *Regulatory Peptides* **2012**, 176(1-3):51-56
4. Skrzypski M, Kaczmarek P, Le TT, **Wojciechowicz T**, Pruszyńska-Oszmałek E, Szczepankiewicz D, Sassek M, Arafat A, Wiedenmann B, Nowak KW, Strowski MZ.

- Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Letters* **2012**, 586(23): 4157-4164
5. Pruszyńska-Oszmałek E, Szczepankiewicz D, Hertig I, Skrzypski M, Sassek M, Kaczmarek P, Kołodziejcki PA, Maćkowiak P, Nowak KW, Strowski MZ, **Wojciechowicz T**. Obestatin inhibits lipogenesis and glucose uptake in isolated primary rat adipocytes. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **2013**, 27(1):23-33
  6. Arafat AM, Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmałek E, Kołodziejcki P, Szczepankiewicz D, Sassek M, **Wojciechowicz T**, Wiedenmann B, Pfeiffer AF, **Nowak KW**, Strowski MZ. Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: a novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? *Diabetologia* **2013**, 56(3):588-97
  7. Skrzypski M, Sassek M, Abdelmessih S, Mergler S, Grötzinger C, Metzke D, **Wojciechowicz T**, Nowak KW, Strowski MZ. Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cellular Signalling* **2014**, 26(1):41-48
  8. Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S, Szczepankiewicz D, Kołodziejcki PA, Metzke D, **Wojciechowicz T**, Billert M, Nowak KW, Strowski MZ. TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research* **2015**, 1853(12):3202-10
  9. **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Kołodziejcki PA, Szczepankiewicz D, Pruszyńska-Oszmałek E, Kaczmarek P, Strowski MZ, Nowak KW. Obestatin stimulates differentiation and regulates lipolysis and leptin secretion in rat preadipocytes. *Molecular Medicine Reports* **2015**, 12(6): 8169-75
  10. **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Szczepankiewicz D, Hertig I, Kołodziejcki PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW. Orexins A and B stimulate proliferation and differentiation of porcine preadipocytes. *Experimental Biology and Medicine* **2016**, 241(16):1786-1795
  11. Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S, Billert M, Szczepankiewicz D, **Wojciechowicz T**, Nowak KW, Strowski MZ. Orexin A modulates INS-1E cell proliferation and insulin secretion via extracellular signal-regulated kinase and transient receptor potential channels. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2016**, 67(5):643-652
  12. Billert M, Skrzypski M, Sassek M, Szczepankiewicz D, **Wojciechowicz T**, Mergler S, Strowski MZ, Nowak KW. TRPV4 regulates insulin mRNA expression and INS-1E cell

- death via ERK1/2 and NO-dependent mechanisms. *Cellular Signalling* **2017**, 35:242-249
13. Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmałek E, Sassek M, Kolodziejcki PA, Billert M, Szczepankiewicz D, **Wojciechowicz T**, Maechler P, Nowak KW, Strowski MZ. Chronic orexin-A (hypocretin-1) treatment of type 2 diabetic rats improves glucose control and beta-cell functions. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2017**, 68(5):669-681
  14. Billert M, **Wojciechowicz T**, Jasaszwili M, Szczepankiewicz D, Waśko J, Kaźmierczak S, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Phoenixin-14 stimulates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes via cAMP/Epac-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids* **2018**, 1863(12):1449-1457
  15. Kołodziejcki PA, Pruszyńska-Oszmałek E, Micker M, Skrzypski M, **Wojciechowicz T**, Szwarckopf P, Skieresz-Szewczyk K, Nowak KW, Strowski MZ. Spexin: A novel regulator of adipogenesis and fat tissue metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids* **2018**, 1863(10):1228-1236
  16. Billert M, Sassek M, **Wojciechowicz T**, Jasaszwili M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Neuropeptide B stimulates insulin secretion and expression but not proliferation in rat insulin-producing INS-1E cells. *Mol Med Rep.* 2019 Aug;20(2):2030-2038. doi: 10.3892/mmr.2019.10415. Epub 2019 Jun 24
  17. Jasaszwili M, **Wojciechowicz T**, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Effects of adropin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells and rat primary preadipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2019** Oct 1;496:110532
  18. Billert M, Sassek M, **Wojciechowicz T**, Jasaszwili M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Neuropeptide B stimulates insulin secretion and expression but not proliferation in rat insulin-producing INS-1E cells. *Molecular Medicine Reports* **2019**; 2030-2038
  19. Jasaszwili M, **Wojciechowicz T**, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin stimulates proliferation but suppresses differentiation in rat primary brown preadipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2020 Aug 13;692:108536. doi: 10.1016/j.abb.2020.108536
  20. **Wojciechowicz T**, Billert M, Dhandapani P, Szczepankiewicz D, Wasielewski O, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Neuropeptide B promotes proliferation and differentiation of rat brown primary preadipocytes. *FEBS Open Bio.* 2021 Apr;11(4):1153-1164

21. Kołodziejcki PA, Pruszyńska-Oszmałek E, **Wojciechowicz T**, Sassek M, Leciejewska N, Jasaszwili M, Billert M, Małek E, Szczepankiewicz D, Misiewicz-Mielnik M, Hertig I, Nogowski L, Nowak KW, Strowski MZ, Skrzypski M. The Role of Peptide Hormones Discovered in the 21st Century in the Regulation of Adipose Tissue Functions. *Genes (Basel)*. 2021 May 17;12(5):756
22. Jasaszwili M, Pruszyńska-Oszmałek E, **Wojciechowicz T**, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin Slightly Modulates Lipolysis, Lipogenesis and Expression of Adipokines but Not Glucose Uptake in Rodent Adipocytes. *Genes (Basel)*. 2021 Jun 13;12(6):914
23. **Wojciechowicz T**, Billert M, Jasaszwili M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. The Role of Neuropeptide B and Its Receptors in Controlling Appetite, Metabolism, and Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 21;22(12):6632
24. Jasaszwili M, **Wojciechowicz T**, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. The effects of neuronostatin on proliferation and differentiation of rat primary preadipocytes and 3T3-L1 cells *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021 Nov;1866(11):159018
25. Skrzypski M, Kołodziejcki PA, Pruszyńska-Oszmałek E, **Wojciechowicz T**, Janicka P, Krążek M, Małek E, Strowski MZ, Nowak KW. Daily Treatment of Mice with Type 2 Diabetes with Adropin for Four Weeks Improves Glucolipid Profile, Reduces Hepatic Lipid Content and Restores Elevated Hepatic Enzymes in Serum. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 29;23(17):9807
26. Wojciechowicz T, Szczepankiewicz D, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Neuropeptide B promotes differentiation of rodent white preadipocytes into mature adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2023 Feb 15;562:111850
27. Wojciechowicz T, Kołodziejcki PA, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. The Effects of Neuropeptide B on Proliferation and Differentiation of Porcine White Preadipocytes into Mature Adipocytes. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 23;24(7):6096

### 5.3 Współpraca z jednostką krajową

**Współpraca naukowa:** Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski, Katedra Biochemii i Chemii, Zakład Biochemii, **prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna**

**Forma współpracy:** udział w doświadczeniu realizowanym w ramach grantu NCN UMO-2016/21/N/NZ5/01932 (PRELUDIUM 11 „Modulacja białka wiążącego kwasy tłuszczowe 4 oraz zmiana zawartości kwasów tłuszczowych w diecie a potencjalna strategia terapeutyczna w leczeniu zespołu jelita nadwrażliwego”), który polegał na pobraniu tkanki tłuszczowej od myszy bytujących na paszy wzbogaconej w dodatek 7% (wagowo) oleju kokosowego, bogatego w średniołańcuchowe FA (MCFA) (COCO) lub 7% oleju z wiesiołka, bogatego w długołańcuchowe FA (LCFA) (EPO) (w każdej grupie połowa myszy otrzymały inhibitor FABP4, BMS309403) w 60-cio dniowym doświadczeniu *in vivo*. Z pobranej tkanki tłuszczowej izolowałam preadipocyty i w prowadzonej hodowli komórkowej zostały przeprowadzone analizy: aktywności proliferacyjnej komórek oraz ekspresji mRNA FABP4 w trakcie adipogenezy.

#### **Efekty współpracy:**

1. Mosińska P, Szczepaniak A, **Wojciechowicz T**, Skrzypski M, Nowak K, Fichna J. Chain length of dietary fatty acids determines gastrointestinal motility and visceromotor function in mice in a fatty acid binding protein 4-dependent manner. *European Journal of Nutrition* **2020** Sep, **59(6)**; 2481–2496

### 5.4 Współpraca naukowa w obrębie Uniwersytetu Przyrodniczego

**Współpraca naukowa:** Wydział Leśny i Technologii Drewna, Katedra Chemii, **dr Kinga Szentner**

**Forma współpracy:** udział w projekcie badawczym NCN 2014/13/B/NZ9/02442 dotyczącym aktywności celulolitycznej ekstraktów z układu pokarmowego owadów pt.: "Enzymatyczna hydroliza celulozy - poszukiwanie nowych kompleksów celulaz". W badaniach prowadzonych w ramach współpracy po raz pierwszy zastosowano ekstrakty z drewnojada *Zophobas morio* w aspekcie hydrolizy celulozy. Analiza ta wykazała, że celuloza mikrokrystaliczna z mniejszymi

rozmiar cząstek był bardziej podatny na obróbkę enzymatyczną. Ponadto nasze badanie aktywności celulazy wykazało inny profil stosowanego enzymu podczas poszczególnych stadiów rozwojowych *Z. morio*. Ekstrakty z jelita środkowego uzyskane. Analiza hydrolizy celulozy potwierdza, że wydajność reakcji ta zależy również od budowy materiałów celulozowych i warunków wewnętrznych reakcji enzymatycznej. W badaniach wykazano, że aktywność celulolityczna ekstraktów z jelita środkowego *Z. morio* z dorosłych owadów jest bardziej skuteczna w rozkładzie celulozy mikrokrystalicznej niż ekstrakty z larw oraz wykazano, że te owady mogą być cennym źródłem celulaz.

### **Efekt współpracy:**

1. Szentner K, Waśkiewicz A, Kaźmierczak S, **Wojciechowicz T**, Goliński P, Lewandowska E, Wasielewski O. Enzymatic hydrolysis of cellulose using extracts from insects. *Carbohydrates Research*. 2019 Nov 1;485:107811

**Współpraca naukowa:** Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Katedra Zoologii, **dr hab. Oskar Wasielewski**

**Forma współpracy:** udział w prowadzeniu badań dotyczących fizjologicznych i biochemicznych aspektów zimowania, diapauzy oraz potencjalnego wpływu zmian klimatu na rozwój murarki ogrodowej *Osmia bicornis*.

### **Efekty współpracy:**

1. Wasielewski O, Giejdasz K, **Wojciechowicz T**, Skrzypski M. Ovary growth and protein levels in ovary and fat body during adult-wintering period in the red mason bee, *Osmia rufa*. *Adipologie* **2011**, 42(6):749-758
2. Wasielewski O, **Wojciechowicz T**, Giejdasz K, Krishnan N. Influence of methoprene and temperature on diapause termination in adult females of the over-wintering solitary bee, *Osmia rufa* L. *Journal of Insect Physiology* **2011**, 57(12):1682-8
3. Wasielewski O, **Wojciechowicz T**, Giejdasz K, Krishnan N. Overwintering strategies in the red mason solitary bee—physiological correlates of midgut metabolic activity and turnover of nutrient reserves in females of *Osmia bicornis*. *Apidologie* **2013**, 44(6):642-656

4. Wasielewski O, Szczepankiewicz D, Giejdasz K, **Wojciechowicz T**, Bednarova A, Krishnan N. The potential role of adiponectin- and resistin-like peptides in the regulation of lipid levels in the hemolymph of over-wintering adult females of *Osmia bicornis*. *Apidologie* **2014**, 45(4):491-503
5. Wasielewski O., **Wojciechowicz T.**, Giejdasz K., Krishnan N. Enhanced UV-B radiation during pupal stage reduce body mass and fat content, while increasing deformities, mortality and cell death in female adults of solitary bee *Osmia bicornis*. *Insect Science* **2015**, 22(4):512-20

**Współpraca naukowa:** Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, **dr inż. Jarosław Czubiński**

**Forma współpracy:** udział w prowadzeniu badań dotyczących wpływu pochodzącego z nasion łubinu izolowanego białka  $\gamma$ -konglutyny na adipogenezę komórek modelowych WAT linii 3T3-L1.

**Efekty współpracy:**

1. **Wojciechowicz T.**, Czubiński J., Billert M., Płóciennik A., Nowak KW., Skrzypski M. Suppressing effects of  $\gamma$ -conglutin on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *International Journal of Food Science and Technology* **2018**, 53(11):2624-2630

## **5.5 Otoczenie gospodarcze**

**Współpraca naukowa:** Współpraca z Centrum Badań DNA w Poznaniu

**Forma współpracy:** Wykonanie badań mających na celu określenie czasu usunięcia pozostałości patogenów przenoszonych przez kleszcze z surowicy krwi myszy.

**Efekt współpracy:** Projekt pt.: „Opracowanie i wdrożenie panelu testów diagnostycznych w kierunku identyfikacji patogenów przenoszonych przez kleszcze” (nr POIG.04.01.00-30-052/09-00). W ramach badań naukowych było wykonanie doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych (myszy szczep BALB/c) w ramach działania POIG 1.4-4.1 nr POIG.04.01.00-30-052/09-00E); 2011.



6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### 6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

#### 6.1.1. Prowadzone zajęcia

Przez cały okres zatrudnienia w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt (dawniej Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt), jako nauczyciel akademicki zatrudniony na stanowisku w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, prowadziłam i prowadzę nauczanie przedmiotów dla studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych.

#### Zajęcia prowadzone w języku polskim:

- Biochemia ogólna (ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia)
- Biochemia z elementami biofizyki (ćwiczenia dla studentów kierunku Zootechnika)
- Fizjologia człowieka (ćwiczenia dla studentów kierunku Dietetyka)
- Fizjologia zwierząt (ćwiczenia dla studentów kierunku Zootechnika)
- Techniki mikroskopowe (ćwiczenia i wykłady dla studentów kierunku Biologia)
- Biologia komórki (ćwiczenia i wykłady, **kierownik przedmiotu**, dla studentów kierunków Biologia i Weterynaria)
- Kultury *in vitro* (ćwiczenia i wykłady, **kierownik przedmiotu**, dla studentów kierunku Biologia)

#### Zajęcia prowadzone dla studentów Szkoły doktorskiej:

- Warsztaty metodyczne i wykłady – Hodowle komórek zwierzęcych *in vitro* – strategie i zastosowanie hodowli pierwotnych a ustalone linie komórkowe (wykład i laboratorium)
- Kurs nowoczesnych technik badawczych *Confocal microscopy in cell culture*, 2021, Studium Doktoranckie

#### Zajęcia prowadzone w języku angielskim

- Warsztaty metodyczne dla studentów Szkoły doktorskiej – Methods of protein research, Doctoral School, Biological Science Discipline

### 6.1.2. Współautorstwo i opracowanie programów przedmiotów

- opracowanie programu ćwiczeń laboratoryjnych oraz wykładów w ramach przedmiotu **Hodowle *in vitro*** dla kierunku Biologia; od 2006 roku jestem kierownikiem tego przedmiotu; przygotowanie kart przedmiotów (sylabusów) dla zajęć laboratoryjnych oraz wykładów
- współautorstwo w opracowaniu programu ćwiczeń i wykładów z przedmiotu **Biologia komórki** dla kierunku Biologia i Weterynaria; od 2015 roku jestem kierownikiem tego przedmiotu; przygotowanie kart przedmiotów (sylabusów) dla zajęć laboratoryjnych oraz wykładów
- współautorstwo w opracowaniu programu ćwiczeń i wykładów z przedmiotu **Techniki mikroskopowe** dla kierunku Biologia.

### 6.1.3 Inne:

- Opiekun roku kierunku Biologia Stosowana (trzykrotnie)
- Opiekun praktyki studenckiej Łukasza Sakowskiego 23.06.2014 – 18.07.2014

### 6.1.4 Promotorstwo/recenzje prac dyplomowych

- Promotor pomocniczy przewodu doktorskiego w toku: mgr inż. Sandra Kaźmierczak; otwarty przewód doktorski w 2019 r. na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, UPP; tytuł rozprawy: „Charakterystyka enzymów celulolitycznych u wybranych gatunków chrząszczy”.
- Promotorstwo 3 prac licencjackich:
  - Berenika Leszkowicz-Baczyńska (2009, Biologia)
  - Paulina Lubczyńska (2009, Biologia)
  - Paweł Antoni Kołodziejcki (2009, Biologia)
- Promotorstwo 12 prac magisterskich:
  - Marta Kasińska (2020 Biologia)
  - Artur Płuciennik (2018, Biotechnologia)
  - Kamila Katarzyna Kempa (2017, Biologia)
  - Joanna Szabelska (2017, Neurobiologia)
  - Patrycja Machyńska (2016, Biologia)

- Natalia Gizińska (2016, Biologia)
- Olga Golkowska (2013, Biologia)
- Martyna Janicka (2013, Biologia)
- Natalia Kałużna (2012, Biologia)
- Paulina Lubczyńska (2011, Biologia)
- Paweł Antoni Kołodziejski (2011, Biologia)
- Iwona Kwiatek (2008, Biologia)
  
- Recenzent 9 prac dyplomowych magisterskich:
  - Samanta Manclawicz (2019, Biologia)
  - Ola Rudzik (2018, Biologia)
  - Karina Płatek (2018, Neurobiologia)
  - Mariami Jasaszwili (Neurobiologia, 2018)
  - Sandra Kaźmierczak (2017, Zootechnika)
  - Kamila Bejenka (2017, Biologia)
  - Karolina Niewiadomska (2017, Biologia)
  - Sylwia Gomuła (2016, Biologia)
  - Luiza Wesołowska (2015, Biologia)
  
- Recenzent 1 pracy dyplomowej licencjackiej:
  - Dominika Mioduszevska (2016, Biologia)
  
- Recenzent 1 pracy dyplomowej inżynierskiej:
  - Agnieszka Brzosowska (2018, Biotechnologia)

#### **6.1.5 Komisje egzaminacyjne:**

- **Egzaminator** na egzaminie dyplomowym licencjackim dla studentów III roku Biologii specjalność **Biologia stosowana** (2018, 2019, 2020, 2020, 2021)
- **Egzaminator** na egzaminach dyplomowych magisterskich

### **6.1.6 Działalność organizacyjna**

#### **a) Udział w zapewnianiu i doskonaleniu jakości kształcenia Uczelni**

- Członek Kierunkowego Zespołu ds. jakości kształcenia dla kierunku Biologia 2016-2019
- Interesariusz Wewnętrzny w Kierunkowym Zespole ds. jakości kształcenia dla kierunku Weterynaria (2013)
- Członek Rady Programowej kierunku Biologia Stosowna 2020
- Członek Komisji Dyscypliny Nauki Biologiczne w Szkole Doktorskiej UPP (od 2019 – 2020)

#### **b) Działalność na rzecz Uczelni**

- Członek Uczelnianej Komisji Dyscyplinarnej dla Nauczycieli Akademickich od 2020 do chwili obecnej
- Członek Wydziałowej Komisji ds. Okresowej Oceny Nauczycieli Akademickich (2014-2016)
- Członek Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UPP (2012-2019)
- Członek Senackiej Komisji do spraw Finansów i Budżetu Uczelni (2008 – 2012)
- Opieka nad Pracownią Biologii Komórki Katedry Fizjologii i Biochemii Zwierząt, w tym opieka nad mikroskopem konfokalnym LSM510 Meta Zeiss
- Członek Wydziałowego Zespołu ds. Opracowania Dokumentacji na Potrzeby Ewaluacji (2020-2021, 2023-obecnie)

#### **c) Organizacja konferencji/symposium:**

- Udział w organizacji oraz pełnienie funkcji skarbnika VI Krajowej Konferencji Adeptów Fizjologii, Poznań 2009
- Członek jury XV Symposium Wydziałowego Studenckiego Koła Naukowego Zootechników i Biologów 8.05.2014 rok

#### d) Osiągnięcia popularyzujące naukę

- Wykład otwarty dla słuchaczy Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki „Wszystkie odcienie tkanki tłuszczowej” 23-26.04.2017
  - Pomoc w przygotowaniu i realizacji pobytu uczniów klasy I ze Szkoły Podstawowej i Gimnazjum Akademickiego Da Vinci w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt dnia 30 maja 2014 roku
  - udział w „Dniach otwartych” UPP (zapoznanie młodzieży z Pracownią biologii komórki i stanowiskiem mikroskopowym konfokalnym i fluorescencyjnym)
  - współautorstwo popularnonaukowej publikacji „Biologiczna rola neuronostatyny, hormonu kodowanego przez gen somatostatyny” Krążek M., Ligęza A., Wojciechowicz T., Skrzypski M, Postępy biochemii, 2023 [https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_476](https://doi.org/10.18388/pb.2021_476)
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

#### 7.1 Kierownik i wykonawca projektów badawczych

- **NCN OPUS 2016/21/B/NZ9/00943** „Rola neuropeptydu B w regulacji funkcji preadipocytów szczura i świni” (2017-2020), **kierownik projektu**
- **N N303 319337** projekt finansowany przez Komitet Badań Naukowych: „Rola obestatyny w regulacji metabolizmu adipocytów białej tkanki tłuszczowej szczura” (2009-2013), **kierownik projektu**

##### Wykonawca i udział w realizacji projektów:

- **NCN OPUS 2022/45/B/NZ5/03453** „Wpływ feniksyny na białe i brunatne adipocyty oraz metabolizm i tkankę tłuszczową w otyłości” (2023-2026), kierownik projektu: prof. UPP, dr hab. Marek Skrzypski
- **NCN SONATA 2016/23/D/NZ4/03557** „Rola adropiny w regulacji funkcji adipocytów oraz komórek alfa i beta wysp trzustkowych” (2017-2020), kierownik projektu: prof. UPP, dr hab. Marek Skrzypski
- **NCN OPUS 2014/13/B/NZ9/02442** „Enzymatyczna hydroliza celulozy – poszukiwanie nowych kompleksów celulaz” (2015-2018), kierownik projektu: dr Kinga Szentner

- **Iuventus Plus IP2014 042273** „Rola receptora waniloidowego TRPV4 w regulacji wybranych funkcji komórek beta wysp trzustki” (2015-2017), kierownik projektu: dr Marek Skrzypski
- **NCN PRELUDIUM 2011/03/N/NZ4/02965** „Rola 1 i 2 typu receptora oreksyn (OXR1, OXR2) w regulacji funkcji komórek alfa i beta trzustki” (2012-2015), kierownik projektu: dr Marek Skrzypski
- **N N311 508339** - „Rola oreksyn w hormonalnej regulacji metabolizmu energetycznego przez oś adipoinśularną świni” (2010-2013), kierownik projektu: prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak
- **N N401 062435** „Wpływ Neuromedyny U (NmU) na funkcję endokrynną i metabolizm węglowodanowo - lipidowy tkanki tłuszczowej szczura” (2008–2010), kierownik projektu: dr Przemysław Kaczmarek
- **N N 311 298935** – „Hormonalna regulacja diapauzy u murarki ogrodowej *Osmia rufa* L. (Apoidea: Megachilidae)” (2009-2010), kierownik projektu: dr hab. Oskar Wasielewski
- **2 P06D 028 30** – „Rola greliny w endokrynnych i parakrynnych mechanizmach kontroli sekrecji insuliny” (2006-2008), grant własny, kierownik projektu: prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak
- **2 P06T 038 30** – „Opracowanie metody syntezy nowych związków kompleksowych chromu(III) oraz ocena aktywności biologicznej i możliwości ich wykorzystania do suplementacji diety i/lub wspomagania leczenia insulinooporności” (2006-2008), kierownik projektu: dr hab. Zbigniew Krejpcio
- **2 P06D 050 28** – „Potencjalna rola greliny w regulacji funkcji endokryennej pęcherzyka jajnikowego świni *in vitro*” (2005-2006), **grant promotorski**
- **6 P06D 039-20** – Oreksyny jako modulatory funkcji endokryennej trzustki i osi adipoinśularnej. (2001-2003), kierownik projektu: prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak
- **PBZ-KBN-084/P06/2002/3.3** – „Rola hormonów osi adipoinśularnej w ciąży” (2003-2005), grant zamawiany
- **PBZ-KBN-084/P06/2002/3.1** – „Ekspresja receptora leptyny (Ob-Rb) i udział tego hormonu w regulacji funkcji endokryennej jajnika świni”. (2003-2005), grant zamawiany
- **PBZ-KBN-113/P06/204/10** – „Postnatalna ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm lipidowy komórki mięśniowej i jej związek z cechami mięsa świn” (2005-2008), grant zamawiany

## 7.2 Nagrody za pracę naukową

**Nagroda zespołowa I stopnia** Rektora Uniwersytetu przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia naukowe w zakresie nauk o zwierzętach 2020r.

**Nagroda zespołowa II stopnia** Rektora Uniwersytetu przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami 2016r.

**Nagroda zespołowa I stopnia** Rektora Uniwersytetu przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami 2014r.

**Nagroda zespołowa I stopnia** Rektora Uniwersytetu przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami 2010r.

**Nagroda zespołowa II stopnia** Rektora Uniwersytetu przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami 2007r.

## 7.3 Członkostwo w organizacjach naukowych


- Członek (od 2005-do chwili obecnej) i skarbnik (2005 - 2011) Oddziału Poznańskiego Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego

## 7.4 Recenzje dla czasopism naukowych

W przebiegu lat pracy zawodowej wykonałam 9 recenzji do czasopism naukowych (szczegóły w załączniku „Wykaz osiągnięć naukowych kandydata”).

## 7.5 Parametry naukowe kandydata na dzień 30.06.2023

- według bazy Web of Science Core Collection – **705**
- według bazy Web of Science Core Collection – **620** (bez autocytowań),
- Indeks Hirsha (Web of Science Core Collection) – **18**
- według bazy SCOPUS – **804**
- według bazy SCOPUS – **717** (bez autocytowań)
- Indeks Hirsha (SCOPUS) - **18**

  
(podpis wnioskodawcy)