

## **AUTOREFERAT**

**dr n. wet. Adam Brodzki**

**Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

**Lublin 2015**

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i nazwisko

Adam Brodzki

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

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie rok 2003, tytuł rozprawy doktorskiej: Wolne aminokwasy , oraz magnez, miedź i cynk w nowotworach skóry, tkanki podskórnej i gruczołu sutkowego u psów.
- tytuł: lekarz weterynarii: Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, Lublin 1995.

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od roku 1995 do 2003 - najpierw Akademia Rolnicza, a następnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie na stanowiskach:

3.1 **1995 - 2004** - Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Akademia Rolnicza w Lublinie, asystent.

3.2 **2004 – do dnia dzisiejszego** Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, adiunkt.

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

4.1 Jednotematyczny cykl publikacji:

„Badania nad nowotworami okolicy odbytu u psów”

publikacje:

Lp.	Tytuł czasopisma	Punkty IF i MNiSz
1	Brodzki A., Brodzki P., Szpetnar M., Tatar M. R.: Serum concentration of free amino acids in dogs suffering from perianal tumours. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 47- 52, 2013.	<b>IF -0.365</b> Punkty MNiSz <b>20</b>
2	Adam Brodzki A., Marcin R. Tatar M. R., Brodzki P.: Serum concentration of magnesium in dogs suffering from tumors of the perianal glands. Magnesium Research 26, 87-92, 2013.	<b>IF -1.556</b> Punkty MNiSz <b>15</b>
3	Brodzki A., Łopuszyński W., Brodzki P., Tatar MR. :Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. Folia Biologica Vol.62 nr 3, 235-241, 2014.	<b>IF-0.882</b> Punkty MNiSz <b>15</b>
4	Sobczyńska-Rak A., Brodzki A.: VEGF and 17- $\beta$ -estradiol Levels after tamoxifen Administration in Canine Hepatoid Gland Adenomas and Hepatoid Gland Epitheliomas. In Vivo 28. 871-878. 2014.	<b>IF-0.974</b> Punkty MNiSz <b>20</b>
5	Brodzki A., Sobczyńska- Rak A., Brodzki P., Tatar MR., Silmanowicz P.: Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów odbytu u psów samców. Med. Wet. 70, 585-648, 2014	<b>IF-0.285</b> Punkty MNiSz <b>15</b>
6	Brodzki A., Brodzki P., Tatar M R., Kostro K.: Total antioxidative status and zinc concentration in dogs suffering from perianal tumors. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 47 - 52, 2015.	<b>IF-0,365</b> Punkty MNiSz <b>15</b>
<b>ŁĄCZNA PUNKTACJA 6 PUBLIKACJI</b>		<b>IF-4,427</b> Punkty MNiSz <b>100</b>

- 4.1.1. Brodzki A., Brodzki P., Szpetnar M., Tataro M. R.: Serum concentration of free amino acids in dogs suffering from perianal tumours. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 47- 52, 2013.

(Punkty MNiSzW<sub>2013</sub> 20, IF<sub>2013</sub> = 0.365)

Wkład w autorstwo 85% opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w opracowaniu metodyki badań (przygotowanie antygenu), współudział w zbieraniu materiału, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji.

- 4.1.2. Adam Brodzki A., Marcin R. Tataro M. R., Brodzki P.: Serum concentration of magnesium in dogs suffering from tumors of the perianal glands. Magnesium Research 26, 87-92, 2013.

(Punkty MNiSzW<sub>2013</sub> 15, IF<sub>2013</sub> = 1.556).

Wkład w autorstwo 85% opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w opracowaniu metodyki badań (przygotowanie antygenu), współudział w zbieraniu materiału, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji.

- 4.1.3. Brodzki A., Łopuszyński W., Brodzki P., Tataro MR. : Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. Folia Biologica Vol.62 nr 3, 235-241, 2014.

(Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 15, IF<sub>2014</sub> = 0.882).

Wkład w autorstwo 80% opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w zbieraniu materiału, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji.

- 4.1.4. Sobczyńska-Rak A., Brodzki A.: VEGF and 17- $\beta$ -estradiol Levels after tamoxifen Administration in Canine Hepatoid Gland Adenomas and Hepatoid Gland Epitheliomas. *In Vivo* 28, 871-878, 2014. **Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 20, IF<sub>2014</sub> = 0.974).**

Wkład w autorstwo 50% współudział w opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w opracowaniu metodyki badań zbieranie materiału biologicznego, interpretacja wyników badań, współudział w przygotowaniu publikacji.

- 4.1.5. Brodzki A., Sobczyńska- Rak A., Brodzki P., Tataro MR., Silmanowicz P.: Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów odbytu u psów samców. *Med. Wet.* 70, 585-648, 2014. **(Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 15, IF<sub>2014</sub> = 0.218).**

Wkład w autorstwo 70% współudział w opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w opracowaniu metodyki badań współudział w zbieraniu materiału, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji.

- 4.1.6. Brodzki A., Brodzki P., Tataro M R., Kostro K.: Total antioxidative status and zinc concentration in dogs suffering from perianal tumors. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57, 47-52, 2015. **(Punkty MNiSzW<sub>2014</sub> 20, IF<sub>2014</sub> = 0.365)**

Wkład w autorstwo 85 %, opracowanie koncepcji badań, określenie celu badań, współudział w zbieraniu materiału, wykonanie badań laboratoryjnych, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji.

- 4.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Badania związane z onkologią weterynaryjną w różnych aspektach prowadzę od początku mojej pracy zawodowej w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt. Tematyką zmian nowotworowych w

okolicy odbytu u psów samców zajmuję się od 2006 roku. Prowadzone badania i obserwacja wyników leczenia tego rodzaju nowotworów oraz konfrontacja badań własnych z danymi dostępnymi w piśmiennictwie zaowocowały opracowaniem projektu badawczego pt. "Skuteczność leczenia farmakologicznego i chirurgicznego nowotworów hormonozależnych psów, monitorowanych koncentracją adduktów DNA w zależności od rodzaju stwierdzonych receptorów i zastosowanego leczenia." Projekt ten otrzymał finansowanie w 2009 roku z MNiSZW.

Skóra jest zewnętrzną powłoką ciała, spełniającą ważne czynności dla sprawnego funkcjonowania organizmu. Stanowi ona a zwłaszcza naskórek, barierę ochronną nieprzepuszczalną dla wody i drobnoustrojów, chroni organizm przed zbyt intensywnym promieniowaniem słonecznym i jest istotnym regulatorem ciepła. W swojej funkcji barierotwórczej w stosunku do otoczenia skóra jest wystawiona na działanie wielu zewnętrznych czynników kancerogennych. Nie może więc dziwić fakt, że nowotwory najczęściej dotyczą właśnie skóry (25, 29, 36, 39, 60).

Nowotworzeniu ulegają wszystkie struktury wchodzące w skład powłoki wspólnej oraz tkanka podskórna, która jest z nią ściśle związana. Nowotwory skóry i tkanki podskórnej występują u psów najczęściej (5, 12., 15, 19, 30, 32, 35, 38, 51, 58, 60). Stanowią one 1/3 wszystkich nowotworów diagnozowanych u psów a 20-30% z nich ma charakter złośliwy (25, 60). Istotną z klinicznego punktu widzenia grupę stanowią nowotwory skóry w okolicy palców. Do najczęściej obserwowanych nowotworów złośliwych tej okolicy zalicza się: raka płaskonabłonkowego oraz czerniaka złośliwego. Diagnozowane są także nowotwory pochodzenia mezenchymalnego, a wśród nich guzy komórek tłuszczowych, kostniako- i chrzęstniakomięsaki, złośliwe nowotwory nabłonka naczyniowego oraz inne mięsaki tkanek miękkich (15).

Okolica odbytu u psów cechuje się występowaniem charakterystycznych dla niej gruczołów. Oprócz typowych, apokrynowych gruczołów zatok przyodbytowych, znajdują się w tej okolicy gruczoły okołodobytowe (hepatoidalne). Są to niekompletne gruczoły łojowe. U zwierząt domowych stwierdzone są jedynie u psa. Zlokalizowane są w promieniu 2-3 cm od odbytu a także na napletku, na skórze wewnętrznej powierzchni kończyn miednicznych, sporadycznie w innych okolicach ciała i ogonie. Na skórze ogona zlokalizowane są w okolicy 9 kręgu ogonowego zarówno po stronie grzbietowej jak i brzusznej ogona. Nowotwory gruczołów okołodobytowych występują u psów samców najczęściej w wieku powyżej 8-9 lat. Stanowią jeden z najczęstszych nowotworów skóry (35, 39, 40). W dostępnym piśmiennictwie sugeruje się wpływ hormonów estrogenowych i androgenowych na ich powstawanie. Stwierdzono obecność receptorów estrogenowych, progesteronowych i androgenowych w tkance guza oraz w niezmienionej tkance gruczołowej (7, 33, 46, 56) i estrogenów (30). U dorosłych i starszych psów pod wpływem stymulacji hormonalnej dochodzi często do hiperplazji w obrębie tych gruczołów oraz progresji w kierunku nowotworowym. U samic natomiast wraz z wiekiem obserwuje się powolną

regresję gruczołów, co ma prawdopodobnie związek z oddziaływaniem estrogenów. Dokładna etiologia nowotworów gruczołów przyodbytowych pozostaje niewyjaśniona tym niemniej dane dotyczące występowania ich w związku z płcią wskazują na duży udział czynników hormonalnych w ich powstawaniu (19). Najczęściej występującymi nowotworami są gruczolaki (hepatoid gland adenomas) oraz gruczolakoraki (*hepatoid gland adenocarcinomas*). Według danych z piśmiennictwa stanowią one 9-18 % wszystkich nowotworów skóry notowanych u psów (6, 7, 18, 24, 57, 58). Niektóre publikacje wykazują ochronną rolę estrogenów przed karcinogenezą. Zbadano, że podając psom chorym na gruczolaka preparaty estrogenowe lub wykonując zabieg kastracji obserwuje się częściową lub całkowitą remisję nowotworu (59). Innym przykładem ochronnej roli estrogenów przytaczanym w piśmiennictwie jest fakt, że u samic nowotwory gruczołów okołoodbytowych występują niemal wyłącznie u suk poddanych zabiegowi ovariectomii, po której niski poziom estrogenów nie tłumi wzrostu guza (33).

Zmniejszenie częstotliwości występowania nowotworów gruczołów okołoodbytowych obserwowano u psów z guzem komórek Sertoliego jąder, (sertolioma), który wydziela estrogeny. Za ochronną rolę estrogenów przemawia także zjawisko wzrostu częstotliwości guzów okołoodbytowych u suk wysterylizowanych. Zaburzona produkcja estrogenów obserwowana po ovariectomii powoduje obniżenie produkcji estrogenów pełniących rolę ochronną i zwiększa zachorowalność samic na guzy okolicy okołoodbytowej. Komórki gruczołów okołoodbytowych wykazują „dymorfizm płciowy”, ponieważ u dorosłych samic występuje zanik gruczołów do pojedynczych wysp, natomiast u dorosłych samców tworzą się masy gruczołowe (48, 55). W dostępnym piśmiennictwie opisanych jest wiele możliwych do zastosowania metod leczenia opisywanych guzów okolicy odbytu, od małoinwazyjnego leczenia hormonalnego, kriochirurgię, poprzez kastrację, chirurgiczną resekcję guza do elektrochemioterapii i radioterapii włącznie. Dobór metod zależał od rodzaju nowotworu, jego wielkości, złośliwości oraz obecności przerzutów (6, 19, 22, 42).

Główną metodą leczenia jest chirurgiczne usunięcie guza, co niesie duże ryzyko anestezyjologiczne zwykle z powodu zaawansowanego wieku psów zapadających na ten nowotwór. Okolica umiejscowienia i często zaawansowany rozwój guzów niejednokrotnie uniemożliwiają doszczętne usunięcie nowotworu. Brak możliwości usunięcia guza z marginesem zdrowej tkanki powoduje duży odsetek wznów po leczeniu chirurgicznym. Powody te skłaniają do poszukiwania innych sposobów leczenia, które mogłyby stanowić skuteczną terapię tych nowotworów bądź mogłyby być terapią wspomagającą leczenie chirurgiczne. W związku z hormonalnym tłem zmian nowotworowych gruczołów okołoodbytowych podejmowane jest leczenie środkami farmakologicznymi działającymi antyestrogenowo. Ten rodzaj terapii przynosi pożądany efekt terapeutyczny w około 30-40% przypadków. U dużego odsetka psów leczonych tą metodą dochodzi do wznowy po 3-6 miesiącach po

odstawieniu leków. Z powodu obecności receptorów androgenowych w tkance nowotworowej jako metodę leczenia stosuje się także kastrację zwierząt. Jednak w licznych przypadkach po zabiegu stwierdza się wznowę procesu nowotworowego. Istnieje więc prawdopodobieństwo występowania lub współistnienia innych receptorów w tkance nowotworowej gruczołów okołoodbytowych, a w związku z tym możliwości wywoływania transformacji nowotworowej przez inne substancje. Identyfikacja receptorów występujących w tkance nowotworowej gruczołów okołoodbytowych umożliwiłaby poznanie przyczyny nowotworzenia w tej okolicy i zwiększy także skuteczność leczenia. Przeprowadzone badania własne wykazały, że immunohistochemiczna ocena rodzaju receptorów w tkance guza, umożliwia doprecyzowanie sposobu leczenia danego guza. Jednakże, wymaga ona specjalistycznego sprzętu, kosztownych odczynników i doświadczonego histopatologa, który potrafi wykonać badanie i zinterpretować jego wyniki. Czynniki powyższe ograniczają dostępność tego badania dla szerokiej grupy praktykujących lekarzy weterynarii.

We wspomnianych wcześniej badaniach udowodniono obecność receptorów dla hormonów steroidowych w komórkach prawidłowych jak i zmienionych nowotworowo gruczołów, co wskazuje na potencjalną możliwość zastosowania ich leczenia farmakologicznego (22, 23, 34, 46). Wprowadzenie w 1974 roku przez Taylora i Burnsa techniki immunoperoksydazowej do badań histopatologicznych umożliwiło wykrycie i uwidocznienie w preparatach szeregu białek regulatorowych, których ekspresja zmienia się w zależności od faz cyklu komórkowego (8, 54). Obecnie wiadomo, że zarówno niezmienione gruczoły hepatoidalne okolicy odbytu jak i gruczoły zmienione nowotworowo posiadają receptory androgenowe i estrogenowe. Hormony estrogenowe jak i androgenowe pobudzają receptory powodując proliferację nowotworową. Podejmuje się leczenie zachowawcze lekami działającymi antyandrogenowo oraz antyestrogenowo. *Sugeruje się, że takie postępowanie terapeutyczne może być korzystne w leczeniu guzów okołoodbytowych (46).*

Powszechnie dostępnym, możliwym do wykonania dla wszystkich lekarzy weterynarii praktyków, a jednocześnie tańszym od badań immunohistochemicznych wariantem jest określenie stężenia poziomu hormonów płciowych w surowicy krwi chorych psów. Na podstawie stężenia tych hormonów w badaniach własnych podejmowano leczenie antyhormonalne preparatem Tamoksifen. Porównywano obraz kliniczny okolicy odbytu psa przed i po leczeniu, co zostało utrwalone na zdjęciach makroskopowych oraz pobierano krew w celu kontroli stężenia testosteronu w surowicy krwi. Po miesiącu terapii w 90% przypadków guzy okolicy odbytu ulegały zupełnej atrofii a stężenie testosteronu i 17-beta-estradiolu powracało do wartości stwierdzanych u psów zdrowych grupy kontrolnej. W około 10 % przypadków guzy znacznie się zmniejszały, do około 50% wielkości, nie krwawiły, ale wynik leczenia uznawano za niezadowalający. W takich przypadkach podawanie preparatu przedłużano o 2-3 tygodnie i po tym czasie zalecano ponowne badanie kontrolne. Guzy małej złośliwości (nabłoniaki) w



większości ulegały całkowitej atrofii. a poziom badanych hormonów płciowych osiągał wartości prawidłowe, natomiast guzy rozpoznane histopatologicznie jako złośliwe (rak) i 40% guzów o średniej złośliwości histopatologicznej nie znikaly zupełnie i w okresie kontrolnym do 6 miesięcy następowała progresja choroby. Nie notowano poważniejszych objawów ubocznych leczenia preparatem Androcur i Tamoxifen. W dwóch przypadkach po leczeniu preparatem Androcur u psów zaobserwowano obrzęk i tkliwość gruczołów sutkowych (ginekomastia). Tamoxifen był dobrze tolerowany przez psy i nie zaobserwowano objawów ubocznych działania tego leku.

W czasie leczenia antyhormalnego psów zaobserwowano zmiany koncentracji wolnych aminokwasów w surowicy krwi w porównaniu z surowicą psów z grupy kontrolnej. Zmiany koncentracji wolnych aminokwasów mogą pełnić rolę prognostyczną efektów leczenia. Oceniano także stężenie magnezu i cynku, ważnych mikroelementów aktywujących enzymy antyoksydacyjne. Magnez i cynk pełnią w organizmie człowieka i zwierząt bardzo ważną rolę w procesach biochemicznych fizjologicznych i immunologicznych a także w powstawaniu wolnych rodników tlenowych (61).

Ważnym badaniem w postępowaniu terapeutycznym było określenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego przed leczeniem w trakcie i po jego zakończeniu. Proces kancerogenezy jest długotrwały i wieloetapowy. Główną przyczyną inicjacji nowotworowej jest uszkodzenie DNA spowodowane przez czynniki mutagenne. Istotną rolę w przebiegu procesu nowotworowego odgrywają wolne rodniki powstające w organizmie (11). Z badań własnych wynika, że status antyoksydacyjny obniża się znacznie u psów z nowotworami złośliwymi okolicy odbytu po 6 miesiącach leczenia antyhormalnego. Obniża się również skuteczność leczenia przeciwnowotworowego. Na podstawie badań epidemiologicznych wykazano, że podawanie dużych ilości witaminy A, C i E w znacznym stopniu obniża ryzyko zachorowania na choroby nowotworowe (49). Ponadto przeciwutleniacze odgrywają także ważną rolę w hamowaniu rozwoju i w niszczeniu nowotworów. Przyjmuje się, że działają one w trzech płaszczyznach. Po pierwsze podnoszą odporność immunologiczną organizmu, po drugie niszczą guza poprzez kontrolę aktywności genu p53. Trzecim bardzo istotnym mechanizmem niszczenia komórek nowotworowych jest inhibicja angiogenezy (3). Założono, że prawdopodobnie po włączeniu antyoksydantów po 6 miesiącach leczenia psów z nowotworami złośliwymi, wzmożłoby się działanie antynowotworowe i poprawiłaby się skuteczność terapii.

Jedną z głównych cech rozwoju raka jest występowanie zmian w ilości komórek proliferujących i apoptotycznych wewnątrz patologicznej tkanki. Procesy pojawiające się wraz z replikacją DNA, w normalnych tkankach i komórkach zmienionych, są związane z występowaniem jądrowego antygeny komórek proliferujących. Ocena stopnia intensywności proliferacji komórek jest prowadzona na podstawie ekspresji dwóch protein: jądrowego antygeny proliferacji komórkowej (PCNA) oraz antygeny Ki- 67. Antygeny te należą do wewnątrzjądrowych kwasowych niehistonowych białek i biorą udział w

podziale komórki. Białko PCNA uczestniczy w replikacji i naprawie uszkodzeń DNA. Pojawia się w jądrze komórkowym w końcowym okresie fazy G1 cyklu komórkowego a maksymalną koncentrację osiąga w fazie S i obniża się w fazie G2 (9, 31). Istnieje zależność pomiędzy wartościami wskaźników proliferacji (PCNA, Ki-67) a czasem remisji nowotworu lub czasem przeżycia u ludzi (4, 10, 17, 20, 21, 41, 45, 53). Takie same obserwacje poczyniono u psów przy nowotworach guza komórek tłuszczowych, czerniakach, mięsakiach tkanek miękkich oraz chłoniaka złośliwego (1, 26, 27, 47). Proliferację i jej wartości diagnostyczne i prognostyczne w guzach okolicy odbytu oceniał Martins i współpracownicy na podstawie poziomu antygenu PCNA. Jego obserwacje potwierdzają wysoką wartość diagnostyczną i prognostyczną tego parametru (28, 43). W badaniach własnych stwierdzono najwyższą aktywność proliferacyjną (Ki-67) w rakach a najniższą w gruczolakach. Badania własne określające aktywność proliferacyjną guzów okolicy odbytu na podstawie antygenu Ki-67 potwierdzają wyniki innych autorów prowadzących podobne badania hormonozależnych nowotworów jajnika u kobiet (2, 16, 50, 62). Wykazano także możliwość immunologicznej etiologii guzów jajnika u kobiet. Z obserwacji własnych wynika, że guzom okolicy odbytu u psów często towarzyszącemu stan zapalny. Miejscowy stan zapalny uaktywnia układ immunologiczny przez wytwarzanie cytokin, interleukiny 1 i czynników wzrostu. Pobudzają angiogenezę, proliferację komórkową i powstawanie aktywnych form tlenu działających na proliferujące komórki mutagennie. Działanie tych czynników powoduje wzrost guza, uaktywnia angiogenezę i hamuje apoptozę (37, 62). W świetle tych spostrzeżeń celowe było kontynuowanie badań własnych.

Mimo ciągłego udoskonalania metod leczniczych w postępowaniu u chorych ludzi i zwierząt wyleczalność choroby nowotworowej poprawia się nieznacznie. Uznane kliniczne i histologiczne czynniki prognostyczne nie są wystarczające w ustaleniu rokowania u konkretnego chorego. Koniecznym staje się, więc poszukiwanie kolejnych, niezależnych wskaźników rokowniczych. Badania ostatnich lat wskazują na prognostyczne znaczenie oceny angiogenezy. Jest to wieloetapowy proces prowadzący do powstania nowego naczynia, obecny zarówno w warunkach fizjologicznych (gojenie się ran), jak i patologicznych (zapalenia, nowotwory). Rozwój guzów powyżej wielkości 2-3 mm (graniczna wielkość, dla której możliwe jest odżywianie komórek na drodze prostej dyfuzji jest zależny od wytworzenia nowej sieci naczyń i dostarczenia przez nie składników odżywczych, czynników wzrostu i tlenu (13, 14, 52). Rozpoczęcie angiogenezy może być wywołane zarówno niedotlenieniem komórek, jak i mutacjami genów supresorowych i onkogenów, prowadzącymi do powstania tzw. fenotypu angiogenego, tj. stanu, w którym komórki nowotworowe stale wydzielają czynniki pobudzające angiogenezę (44, 52). W wyniku tych nakładających się procesów komórki nowotworowe aktywują swoiste czynniki stymulujące migracje i podziały komórek śródbłonna naczyń krwionośnych w najbliższym sąsiedztwie guza, powodując powstanie sieci naczyń oplatających i penetrujących. W

światle danych z piśmiennictwa wykonano podobne badania oceny poziomu VEGF u psów z guzami okolicy odbytu przed, w trakcie i po leczeniu antyhormalnym. Pozwalają one na wprowadzenie odpowiednio dobranego środka antyhormalnego oraz na prognozowanie wyników leczenia

#### **praca 4.1.1 Badanie profilu wolnych aminokwasów w surowicy psów z nowotworami okolicy odbytu**

Wraz ze wzrostem nowotworu rośnie ilość metabolizowanych białek, co prowadzi do zmiany profilu wolnych aminokwasów w surowicy krwi chorych zwierząt. Przypuszcza się, że różne guzy w odmienny sposób wpływają na profil wolnych aminokwasów. Potwierdzono korelację między zawartością aminokwasów w tkance nowotworowej i surowicy. Ten związek świadczy o tym, że tkanka guza współzawodniczy ze zdrowymi tkankami o aminokwasy, szczególnie siarkowe, a przyspieszona synteza białek w nowotworze wymaga ich dużej ilości. Wskazuje się na możliwość wykorzystania zależności do diagnostyki nowotworów.

Celem badań było określenie stężenia wolnych aminokwasów w surowicy psów samców z nowotworami złośliwymi i niezłośliwymi okolicy odbytu. Określano stężenie wolnych aminokwasów w surowicy krwi psów przed antyhormalnym leczeniem oraz w trakcie leczenia oraz w surowicy psów zdrowych z grupy kontrolnej.

Badania wykonano przy użyciu aparatu do automatycznej analizy aminokwasów AAA-400 produkcji czeskiej, gdzie do oznaczania stężenia wolnych aminokwasów zastosowano metodę chromatografii jonowymiennej. Badania przeprowadzono u 45 psów w wieku 9 – 14 lat, które zgodnie z wynikami badań histopatologicznych, zostały podzielone na trzy grupy doświadczalne. psy z nowotworami złośliwymi, z nowotworami niezłośliwymi oraz psy zdrowe, które stanowiły grupę kontrolną.

W surowicy psów z nowotworami złośliwymi i niezłośliwymi najwyższą wartość stwierdzono przy stężeniu kwasu glutaminowego zaś najniższą przy stężeniu cysteiny. Porównując stężenie wolnych aminokwasów w surowicy krwi psów z nowotworami złośliwymi ze stężeniem wolnych aminokwasów w surowicy krwi psów grupy kontrolnej różnice statystycznie istotne stwierdzono dla tauryny, kwasu glutaminowego, glicyny, kwasu asparaginowego i alaniny, oraz tyrozyny. W porównaniu do stężenia wolnych aminokwasów w surowicy psów z nowotworami niezłośliwymi i stężenia wolnych aminokwasów w surowicy psów grupy kontrolnej różnicę istotną statystycznie stwierdzono dla treoniny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glutaminy, alaniny, tyrozyny, waliny, metioniny, leucyny i izoleucyny. W koncentracji metioniny, tryptofanu i argininy różnice istotne statystycznie wykazano porównując surowice psów wszystkich trzech badanych grup psów. Aminokwasy podzielono na grupy

według ich właściwości chemicznych.. Różnice istotne statystycznie stwierdzono dla aminokwasów aromatycznych, zasadowych i siarkowych. porównując koncentrację aminokwasów w surowicy psów z nowotworami złośliwymi, niezłośliwymi okolicy odbytu i psów zdrowych grupy kontrolnej. Aminokwasy rozgałęzione wykazywały statystycznie istotną różnicę w porównaniu surowicy psów z nowotworami niezłośliwymi z grupą kontrolną.

Potwierdzono, że zmiana profilu wolnych aminokwasów w tkankach nowotworowych i surowicy krwi jest wynikiem procesów wzrostu komórek organizmu a także nowotworzenia w organizmie ludzi i zwierząt. Rozrost nowotworowy powoduje wzmożenie metabolizmu białka i zmianę profilu aminokwasowego. Wzrost stężenia niektórych aminokwasów zależy od stopnia złośliwości nowotworu. Złośliwy proces nowotworowy prowadzi do wzmożonej syntezy białek w tkance guza. Zmienia się koncentracja wolnych aminokwasów, nie tylko w tkankach, ale także w surowicy krwi, która pośredniczy w ich przekazywaniu.

Wyniki badań własnych znajdują potwierdzenie w publikacjach innych autorów. Zaobserwowali oni podwyższony poziom histydyny w surowicy krwi ludzi z rakiem przewodu pokarmowego, który utrzymuje się we wszystkich stadiach rozwoju nowotworu. Poza histydyną tylko dwa aminokwasy zachowują się podobnie, tj. kwas glutaminowy i cystyna zaś poziom innych aminokwasów obniża się wraz z rozwojem guza by ponownie wzrosnąć przy wystąpieniu przerzutów.

Z przedstawionych badań wynika, że nowotwory złośliwe i niezłośliwe okolicy odbytu prowadzą do zmiany profilu wolnych aminokwasów. Zwiększone zapotrzebowanie guza na aminokwasy znajduje odzwierciedlenie w podwyższeniu poziomu wolnych aminokwasów w surowicy krwi. Podczas rozwoju nowotworu metabolizowana jest większa ilość białka, co w konsekwencji prowadzi do zmiany profilu wolnych aminokwasów w tkance nowotworowej i w surowicy krwi. Badanie profilu wolnych aminokwasów w surowicy krwi może być pomocne w diagnostyce pacjentów z chorobą nowotworową. Wyniki tych badań zostały zawarte w publikacji:

- Brodzki A., Brodzki P., Szpetnar M., Tataro M. R.: Serum concentration of free amino acids in dogs suffering from perianal tumours. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 47-52, 2013. (IF=0,36)

#### **praca 4.1.2 Badania koncentracji magnezu w surowicy psów z nowotworami gruczołów okołodbytowych u psów samców.**

Magnez pełni w organizmie człowieka i zwierząt bardzo ważną rolę w procesach biochemicznych, immunologicznych a także w procesach powstawania wolnych rodników tlenowych. Wpływa on w istotny sposób na układ immunologiczny poprzez pobudzenie produkcji limfocytów i

usprawnienie fagocytozy, a także powoduje osłabienie reakcji zapalnej organizmu. Przy zbyt niskiej ilości magnezu występują zaburzenia w syntezie białka co powoduje spadek poziomu albumin i białek osocza krwi natomiast wzrost poziomu globulin. Konsekwencją tych zmian może być spadek odporności. Badania własne przeprowadzono na surowicy krwi 45 psów samców różnych ras. Psy były leczone zachowawczo w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z powodu nowotworów gruczołów okolicy odbytu. Wiek psów wahał się w granicach od 9 do 14 lat. Absorbcję dla magnezu oznaczano na spektrofotometrze absorbcji atomowej firmy PAY-UNICAM. W tym celu zastosowano lampę spektrofotometryczną magnezową. Lampa emituje światło o określonej długości fali, które jest pochłaniane proporcjonalnie do zawartości tego pierwiastka w próbce.

Koncentrację magnezu oznaczono w surowicy psów zdrowych grupy kontrolnej oraz psów chorych na złośliwe i niezłośliwe nowotwory gruczołów około odbytowych. Wykonano oznaczenia u psów przed leczeniem, 1 miesiąc po rozpoczęciu leczenia i 6 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Wyniki poddano analizie statystycznej. Koncentracja magnezu wzrastała wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu. W grupie kontrolnej stężenie magnezu było najniższe, a nieznacznie wyższe jego stężenie stwierdzono u psów z nowotworami niezłośliwymi (różnica nie była istotna statystycznie). W grupie psów z nowotworami złośliwymi stężenie magnezu było zdecydowanie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej oraz do grupy psów z nowotworami niezłośliwymi. Różnice między grupą psów z nowotworami złośliwymi a grupą kontrolną i psami z nowotworami niezłośliwymi były statystycznie istotne. Psy chore z nowotworami gruczołów około odbytowych poddano leczeniu zachowawczemu (antyhormonalnemu), a w czasie leczenia po 1 i 6 miesiącach kontrolowano koncentrację magnezu w surowicy leczonych psów i prowadzono obserwacje kliniczne efektów leczenia. Stwierdzono, że koncentracja magnezu w grupie psów z nowotworami niezłośliwymi wzrastała wraz długością leczenia. U psów przed leczeniem stężenie magnezu było najniższe, wzrosło po 1 miesiącu leczenia a po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia było najwyższe. Różnice w każdej grupie były istotne statystycznie. Natomiast w grupie psów z nowotworami złośliwymi koncentracja magnezu nieznacznie spadła w porównaniu do psów przed leczeniem, a różnica między tymi grupami nie była istotna statystycznie. Po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia koncentracja tego pierwiastka wzrosła tak, że różnica między grupą po 1 miesiącu leczenia a po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia była istotna statystycznie natomiast różnica w koncentracji magnezu w grupie przed leczeniem i po 6 miesiącach leczenia była niewielka i nie była istotna statystycznie.

Wyniki tych badań znajdują odzwierciedlenie w klinicznych efektach leczenia antyhormonalnego. Guzy niezłośliwe już po 1 miesiącu leczenia ulegają znacznej remisji i zmniejszają swoją wielkość. Po 6 miesiącach terapii prawie wszystkie guzy niezłośliwe ulegają całkowitej remisji i dochodzi do zniknięcia guza. W surowicy krwi zachodzą podobne zmiany w koncentracji magnezu

Podczas leczenia i remisji guza rośnie poziom magnezu w surowicy leczonych psów. Guzy złośliwe powoli ulegają remisji pod wpływem leków antyhormonalnych. Po 1 miesiącu od rozpoczęcia leczenia guzy złośliwe przestają krwawić, ustępuje bolesność i przykry zapach. Na początku wielkość guza nie ulega zmianie. Dopiero po 6 miesiącach leczenia guzy ulegają częściowej remisji. Podobnie zmienia się stężenie magnezu w surowicy krwi leczonych psów. Po 1 miesiącu leczenia stężenie magnezu nie wzrasta a nawet nieznacznie obniża się. Po upływie 6 miesięcy leczenia wraz z widocznym klinicznie zmniejszaniem się średnicy guza koncentracja tego pierwiastka wzrasta, a różnica w porównaniu do psów przed leczeniem i po 1 miesiącu leczenia jest istotna statystycznie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w publikacji:

- Brodzki A., Tatar M. R., Brodzki P.: Serum concentration of magnesium in dogs suffering from tumors of the perianal glands. *Magnesium Research* 26, 87-92, 2013.

#### **praca 4.1.3. Wartości diagnostyczne i prognostyczne proliferacji komórkowej w nowotworach okolicy odbytu u psów.**

Nowotwory okolicy odbytu klinicznie występują jako guzowate, krwawiące twory dookoła odbytu. Etiologia nowotworów wywodzących się z gruczołów okołodobytowych jest mało poznana. Wzrost guzów okolicy odbytu może być modulowany hormonami płciowymi, głównie androgenami. Wyróżnia się trzy histopatologiczne rodzaje nowotworów tej okolicy u psów: gruczolak (adenoma), gruczolakorak (adenocarcinoma) i rak (adenoma). Najczęściej stwierdzane guzy okolicy odbytu u psów to gruczolaki stwierdzone nawet w 80 % przypadków. Gruczolakoraki czasami dają objawy paraneoplastyczne w postaci poliurii i polidypsji w połączeniu z hiperkalcemią i hiperfosfatemią. Przerzuty z raków okołodobytowych mogą lokalizować się w płucach, wątrobie i śledzionie, biodrowych i lędźwiowych węzłach chłonnych. Jedną z głównych cech rozwoju raka jest występowanie zmian w poziomie komórek proliferujących i apoptycznych wewnątrz określonej tkanki. Zdarzenie to pojawiające się wraz z replikacją DNA, w normalnych tkankach i komórkach zmienionych, jest związane z występowaniem jądrowego antygenu komórek proliferujących. Ocena stopnia intensywności proliferacji komórek jest prowadzona na podstawie ekspresji dwóch protein: jądrowego antygenu proliferacji komórkowej (PCNA) oraz antygenu Ki- 67. Antygeny te należą do wewnątrzjądrowych kwasowych niehistonowych białek i biorą udział w podziale komórki. Białko PCNA uczestniczy w replikacji i naprawie uszkodzeń DNA. pojawia się w jądrze komórkowym w końcowym okresie fazy G1 cyklu komórkowego a maksymalną koncentrację osiąga w fazie S i obniża się w fazie G2. Funkcja

białka Ki-67 w komórce nie jest do końca znana, ale prawdopodobnie utrzymuje w czasie mitozy strukturę wyższego DNA. Ekspresja tego białka wzrasta już w połowie fazy G1 i rośnie w S i G2, maksymalne stężenie osiąga w fazie M a następnie jego poziom gwałtownie spada.

Materiał do badań stanowiły biopaty 41 guzów okolicy odbytu pobrane za pomocą trepanu skórniego o średnicy 0,6cm od psów leczonych w Klinice Chirurgii Zwierząt UP w Lublinie oraz 6 wycinków prawidłowej tkanki gruczołów przyodbytowych. Ekspresję antygenu Ki-67 oznaczono z zastosowaniem zestawu przeznaczanego do barwień immunohistochemicznych w tkankach zwierzęcych - Dako-ARK™ (Animal Research Kit, Dako) redukującego tło reakcji niespecyficycznych oraz mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciwko antygenowi Ki-67, klon MIB-1 (Dako) przeznaczanego dla skrawków parafinowych w rozcieńczeniu 1:300. Jako chromogenu użyto czterochlorowodoru-3,3'-dwuaminobenzydyny (DAB - Sigma). W reakcjach immunohistochemicznych stosowano podwójny układ kontroli. Kontrolę ujemną, gdzie inkubację z przeciwciałem pierwotnym zastępowano inkubacją z odpowiednią nieimmunizowaną surowicą IgG i kontrolę dodatnią gdzie inkubację przeprowadzano na tkance o udowodnionej dodatniej reakcji z danym przeciwciałem. W przeprowadzonych badaniach był to migdałek podniebienny zdrowego psa. Do ilościowej oceny ekspresji antygenu Ki-67 wykorzystano system komputerowo wspomaganą analizę obrazu mikroskopowego. W skład zestawu wchodził: mikroskop świetlny (Nikon Eclipse E-600) sprzężony z kamerą cyfrową (Nikon DS-Fi1) oraz komputerem PC z programem do analizy obrazu (NIS-Elements BR-2.20, Laboratory Imaging).

Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność antygenu Ki-67 wystąpił w jądrach komórkowych za wyjątkiem rzadko obserwowanego słabego odczynu w cytoplazmie niektórych komórek nabłonkowych, w tym komórek wykazujących figury podziału mitotycznego. Odczyn miał charakter ziarnisty lub ziarnisto rozlany. Często obserwowano silnie dodatnio wybarwione jąderka i. nie wielkie różnice w intensywności zabarwienia poszczególnych jąder. Charakterystyczna natomiast była heterogenność rozmieszczenia komórek dodatnich. W wycinkach tkanki prawidłowego gruczołu przyodbytowego oraz w przypadku gruczolaków w przewodzie komórki dodatnio lokalizowały się w obwodowej strefie beleczek, wysp i sznurów w grupie komórek bazoidalnych. Jedynie nieliczne komórki hepatoidalne wykazywały reakcję dodatnią. Podobnie w grupie nabłoniaków w większości przypadków komórki o dodatnim odczynie wykazywały morfologię komórek bazoidalnych i zlokalizowane były na obwodzie struktur tworzących utkanie guzów. Tym niemniej w grupie tej obserwowano również komórki hepatoidalne o wyraźnie zabarwionym-dodatnim jądrze komórkowym. W grupie raków dodatnio reagujące nisko zróżnicowane komórki nowotworu były rozrzucone chaotycznie pomiędzy komórkami ujemnymi. Sporadycznie obserwowano zabarwienie jąder komórek podścieliska i śródbłonka naczyńniowego. Za dodatnio reagujące uznawano wszystkie komórki nabłonkowe o wyraźnie

zabarwionym jądrze. Wartości indeksu Ki-67 w badanej grupie rozrostów wahały się od 2,2 do 25,4 %. Najwyższą średnią wartość indeksu antygenu Ki-67 stwierdzono w grupie raków gruczołów okołodbytowych gdzie wynosiła ona 18,5% i różniła się istotnie statystycznie przy  $P=0.01$  pomiędzy średnimi wartościami indeksów w grupie gruczolaków i tkanką prawidłową. W grupach tych średnie wartości indeksu antygenu Ki-67 wynosiły odpowiednio 7,33% i 7,63%. W grupie guzów wykazujących utkanie nabłoniaka gruczołów okołodbytowych średnia wartość indeksu Ki-67 wynosiła 11,95% i nie wykazywała istotnych statystycznie różnic z innymi ocenianymi grupami. Wyniki tych badań zostały zawarte w publikacji :

- Brodzki A., Łopuszyński W., Brodzki P., Tataro MR.: Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. Folia Biologica 3, 235-241, 2014.

#### **praca 4.1.4 Poziom VEGF i 17- $\beta$ -estradiolu u psów z gruczolakami i nabłoniakami okolicy odbytu leczonych tamoxifenem.**

Wśród nowotworów występujących w okolicy odbytu najczęściej stwierdza się gruczolaki i nabłoniaki gruczołów hepatoidalnych. Nowotwory te są powszechnie uznawane za guzy tła hormonalnego gdzie głównym czynnikiem onkogennym są hormony płciowe męskie i żeńskie. Uważa się również, że czynnikiem onkogennym odgrywającym kluczową rolę w rozwoju tych guzów jest czynnik odpowiedzialny za wzrost naczyń krwionośnych – angiogenezę. Fizjologicznie angiogeneza intensywnie zachodzi podczas embriogenezy, owulacji, ciąży oraz w procesie gojenia się ran. Angiogeneza odgrywa również istotną rolę w rozwoju procesu nowotworowego dostarczając rozwijającym się komórkom guza substancji odżywczych i tlenu oraz umożliwia migrację komórek nowotworowych do krwioobiegu zwiększając możliwość przerzutów odległych.

Tamoxifen jest niesterydowym lekiem antyestrogenowym i jest stosowany w leczeniu guzów estrogenozależnych u ludzi i zwierząt., antagonistą receptora estrogenowego. Alternatywnym efektem przeciwnowotworowym jest hamowanie rozwoju naczyń przez modulowanie czynnika VEGF.

Celem pracy była ocena stężenia VEGF w surowicy krwi psów leczonych tamoxifenem z powodu gruczolaków i nabłoniaków okolicy odbytu. Stężenie tego czynnika było badane trzykrotnie:



przed podjęciem leczenia, jeden miesiąc od rozpoczęcia leczenia i sześć miesięcy od rozpoczęcia leczenia.

Materiał do oznaczeń stanowiła surowica krwi 30 psów samców różnych ras. Psy były leczone zachowawczo w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z powodu nowotworów okolicy odbytu. Wiek psów wahał się w granicach od 9 do 14 lat. Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych psów poddawanych zabiegowi kastracji. VEGF w surowicy psów oznaczano przy pomocy testu Elisa (Quantikine Canine Immunoassay; R&D Systems, INC Minneapolis, USA, supplier BLOKOM). 17- $\beta$ -estradiol oznaczano przy użyciu testu Elisa (Immunoenzymatic assay (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France)).

W badanej grupie 30 zwierząt u 12 psów stwierdzono gruczolaka a u 18 psów nabłoniaka gruczołów okołodobytowych. Po 6 miesiącach od rozpoczęcia podawania Tamoxifenu stwierdzono remisję guza u wszystkich badanych psów. Obserwacja leczonych psów trwała przez 6 miesięcy. W tym czasie u 10 psów z gruczolakorakiem nastąpiła progresja choroby do małych, pojedynczych guzów. W badaniu poziomu VEGF u leczonych psów stwierdzono obniżenie się tego czynnika u wszystkich psów w 1 miesiąc od podjęcia leczenia z 13,50 pg/ml do 9,40 pg/ml. Obniżony poziom VEGF utrzymywał się przez 6 miesięcy obserwacji u 20 badanych psów – wszystkich psów z gruczolakami i 8 z nabłoniakami. U 10 psów z nabłoniakami po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia stwierdzono wzrost poziomu VEGF z 9,40 pg/ml do 29,46 pg/ml. Wartości te pokrywały się ze stanem klinicznym ponieważ u 10 psów z nabłoniakiem nastąpiła progresja.

We wszystkich badanych przypadkach leczonych psów prowadzono również badania poziomu 17- $\beta$ -estradiolu w surowicy krwi. Otrzymane wyniki zestawiono z poziomem VEGF. Nie obserwowano korelacji pomiędzy poziomem 17- $\beta$ -estradiolu a poziomem VEGF u psów z gruczolakami gruczołów okołodobytowych w okresie obserwacji. Natomiast stwierdzono korelację tych wartości u psów z nabłoniakiem. Stwierdzono podwyższony poziom obydwu wskaźników w surowicy psów przed leczeniem i w 6 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Wyniki te potwierdzają, że, podwyższony poziom estradiolu powoduje wzrost poziomu VEGF co może powodować progresję procesu nowotworowego przez wzmożoną angiogenezę. Wyniki powyższych badań opublikowano w pracy:

- Sobczyńska-Rak A., Brodzki A.: VEGF and 17- $\beta$ -estradiol Levels after tamoxifen

Administration in Canine Hepatoid Gland Adenomas and Hepatoid Gland Epitheliomas.

In Vivo 28, 871-878, 2014.

#### **praca 4.1.5 Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów odbytu u psów samców.**

Z danych literaturowych wynika, że nowotwory okolicy okołodbytowej wykazują hormonozależność, zarówno na androgeny jak i estrogeny. Hormony po połączeniu się ze specyficznymi dla nich receptorami w tkance gruczołowej, pobudzają szybkie podziały komórkowe i wpływają na rozpoczęcie karcinogenezy. Obecność receptorów androgenowych oraz estrogenowych, zarówno w zdrowej tkance gruczołowej jak i w tkance zmienionej nowotworowo opisana została w wielu publikacjach (Budzyńska, Nill;an Y, Pisani G, Tozon18). Wykazano, że odsetek receptorów androgenowych oraz estrogenowych był znacznie wyższy w komórkach rozrostowych niż zdrowej tkance gruczołowej, co wskazuje na ich udział w rozwoju procesu nowotworowego ((Budzyńska, Nill;an Y, Pisani G, Tozon19).

Obecnie, terapia guzów okolicy odbytu podobnie jak nowotworów dotyczących innych okolic ciała, uzależniona jest od rodzaju nowotworu, jego złośliwości, rozległości zmian oraz ogólnego stanu zdrowia pacjenta. Postępowanie lecznicze obejmuje zazwyczaj chirurgiczne usunięcie zmiany nowotworowej często połączone z kastracją, terapię farmakologiczną oraz w zależności od dostępności radioterapię i krioterapię (Morris J., Dobson J, Nolte I). W związku z hormonozależnością guzów gruczołów przyodbytowych, jednym ze sposobów leczenia lub postępowania wspomagającego terapię przeciwnowotworową jest zastosowanie preparatów antyhormonalnych. Terapia antyhormonalna polega na zastosowaniu leków, które mają zdolność selektywnego łączenia się z receptorami zamiast hormonów, dzięki czemu podziały komórek zależne od obecności hormonu zostają zahamowane. Jednym z preparatów tego typu jest Tamoxifen, niesteroidowy lek antyestrogenowy, należący do selektywnego modulatora receptora estrogenowego (SERM - Selective Estrogen Receptors Modulators), Mechanizm działania leku polega na blokowaniu receptorów estrogenowych i tworzeniu z nimi stabilnych kompleksów w tkankach docelowych (3). Innym lekiem jest Androcur, który wykazuje kompetycyjne działanie antyandrogenowe na wszystkie tkanki i narządy.

Celem podjętych przez autorów badań było określenie, jakiego typu nowotwory dotyczące okolicy okołodbytowej występują u psów utrzymywanych w Lublinie i jego okolicach. Dodatkowym zadaniem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy możliwa i skuteczna jest terapia farmakologiczna hormonozależnych guzów nowotworowych gruczołów przyodbytowych przy użyciu preparatów antyhormonalnych. Uzyskanie pozytywnych wyników terapii guzów nowotworowych preparatami antyestrogenowymi i antyandrogenowymi pozwoli na wprowadzenie do praktyki klinicznej nowej skutecznej metody leczenia zachowawczego nowotworów gruczołów okołodbytowych u psów samców. Badania wykonane zostały na 45 psach samcach w wieku 6-14 lat. Zwierzęta były pacjentami leczonymi z powodu zmian nowotworowych okolicy odbytu w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Materiał do badań stanowiła krew oraz wycinki guzów okolicy odbytu. Krew pobierano z żyły dostępowej (*vena saphena*), do probówek z aktywatorem wykrzepiania Vacutest (Vacutest Kima, Arzergrande, Italy). Po odwirowaniu krwi uzyskaną surowicę przechowywano w temp. – 20°C. W pobranym materiale wykonano badanie poziomu 17-β estradiolu i testosteronu. Oznaczanie poziomu wymienionych hormonów przeprowadzono metodą ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) przy użyciu komercyjnych zestawów do oznaczania testosteronu i 17β estradiolu (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) oraz spektrofotometrycznego czytnika mikroplitek Benchmark Plus, wyposażonego w oprogramowanie Microplate Manager Software V. 5.2.1 (Boi-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornia, USA). Wycinki guzów pobierano przy użyciu trepanu skórniego o średnicy 0,6 cm. Uzyskany materiał dostarczano do Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w celu badania histopatologicznego. Preparaty do oceny histopatologicznej po zabarwieniu hematoksyliną i eozyną, oceniane były w mikroskopie świetlnym (Nikon Eclipse E-600). Ocenę mikroskopową badanych tkanek przeprowadzano w oparciu o histologiczną klasyfikację nowotworów skóry wg AFIP/WHO (5).

Na podstawie otrzymanych wyników badania hormonalnego, podejmowano leczenie farmakologiczne nowotworów. U psów samców poziom testosteronu w warunkach fizjologicznych wynosi 0,5-6 ng/ml. natomiast maksymalna wartość 17-β estradiolu to 15 pg/ml. W przypadku wysokiego poziomu 17-β estradiolu stosowano leczenie preparatem Tamoxifen, w dawce 1 mg/kg m.c. doustnie w formie tabletek. U psów wykazujących niski poziom estradiolu(.....) i wysoki poziom testosteronu (.....)podawano Androcur w dawce 5 mg/kg również doustnie. Leki stosowano przez okres 1 miesiąca.

Na podstawie badań histopatologicznych w badanej grupie zwierząt rozpoznano 27 gruczolaków - (*adenoma*), 14 przypadków nabłoniaka – (*epithelioma*) o niskiej złośliwości oraz 4 nowotwory złośliwe – (*carcinoma*)..

W przypadku nowotworów niezłośliwych (*adenoma*), 90% leczonych zmian ulegała całkowitej remisji, a w okresie 6 miesięcznej obserwacji nie stwierdzono nawrotu choroby. Jedynie w około 10% przypadków, guzy te znacznie się zmniejszały, nie zanikały całkowicie i nie krwawiły. W takich przypadkach leczenie przedłużano o kolejne 2 - 3 tyg., po którym guzy niezłośliwe zanikały całkowicie. Przez okres 6 miesięcznej dalszej obserwacji nie odnotowano wznowy procesu nowotworowego. Nabłoniaki o małej złośliwości (*epithelioma*), w 70% zupełnie zanikały po miesięcznej terapii, a w 30% jedynie zmniejszały swoją średnicę. Przedłużanie terapii nie prowadziło do dalszego zmniejszania się guzów. W okresie 6 miesięcznej obserwacji, 60% nabłoniaków ulegało wznowie. Gruczolakoraki podczas leczenia zmniejszały swoją średnicę, ale nie zanikały całkowicie. Dalsza obserwacja w każdym przypadku tego typu nowotworu wykazywała nasilenie procesu nowotworowego i szybki wzrost guzów. We wszystkich wymienionych typach nowotworów, podczas leczenia, obserwowano zahamowanie ich wzrostu i co bardzo istotne, zahamowanie rozpadu tkanki nowotworowej i niektórych objawów z tym związanych.

Nie notowano poważniejszych objawów ubocznych leczenia preparatem androkur i tamixifen. W dwóch przypadkach po leczeniu preparatem androcur u psów, zaobserwowano obrzęk i tkliwość gruczołów sutkowych (ginekomastia). Tamoksifen był dobrze tolerowany przez psy i nie obserwowano objawów ubocznych działania tego leku. Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że terapia hormonalna jest bezpieczną i skuteczną metodą leczenia nowotworów niezłośliwych, gruczołów okołoodbytowych i powoduje wyleczenie we wszystkich przypadkach. Leczenie nabłoniaków wymaga długotrwałego podawania preparatów antyhormonalnych i powtarzania kuracji, gdy dojdzie do wznowy. Leczenie gruczolakoraków preparatami antyhormonalnymi może być zastosowane w celu wyciszenia procesu nowotworowego, zmniejszenia wielkości guza i poprawy komfortu życia psów zaawansowanych wiekowo, u których stan zdrowia nie pozwala na leczenie chirurgiczne. U psów z mniejszym ryzykiem operacyjnym metodę antyhormonalnego leczenia można stosować łącznie z metodą chirurgii radykalnej. Połączenie tych metod w leczeniu nowotworów złośliwych ogranicza rozległość zmiany i ułatwia przeprowadzenie zabiegu.

Wyniki tych badań zawarto w publikacji:

- Brodzki A., Sobczyńska- Rak A., Brodzki P., Tatara MR., Silmanowicz P.: Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów odbytu u psów samców. Med. Wet. 70, 585-648, 2014.

**praca 4.1.6 Parametry całkowitego statusu antyoksydacyjnego oraz zawartość cynku w surowicy psów z nowotworami okolicy odbytu.**

W prawidłowo funkcjonującym organizmie zachowana jest równowaga pomiędzy powstawaniem a usuwaniem wolnych rodników z organizmu. Zaburzenie tej równowagi i zwiększona produkcja wolnych rodników prowadzi do stresu oksydacyjnego. Ten stan prowadzi do uszkodzenia komórek poprzez uszkodzenie białek i lipidów - elementów budowy komórek oraz prowadzi do mutacji DNA. Wymienione zmiany w komórkach organizmu są przyczyną powstawania zmian nowotworowych. Organizm człowieka i zwierząt wytwarza mechanizmy obronne, które zabezpieczają go przed negatywnym działaniem wolnych rodników tlenowych. Główną rolę ochronną przed negatywnym działaniem wolnych rodników stanowią enzymy: dysmutaza nadadtlenkowa, katalaza, peroksydaza, peroksydaza i reduktaza glutationowa. Enzymem występującym we wszystkich tkankach organizmu metabolizujących tlen i odgrywającym kluczową rolę w ochronie organizmu przed negatywnym działaniem wolnych rodników jest dysmutaza nadadtlenkowa (SOD). Jest to enzym zawierający w swej budowie jony metali Cu, Zn, Mn i Fe.

Biopierwiastki te odgrywają ważną rolę w procesie nowotworzenia. Kumulowanie się miedzi w wątrobie może przyczyniać się do powstawania i rozwoju zmian nowotworowych (Sawaki). Zawartość miedzi i ceruloplazminy w surowicy krwi i moczu chorych na raka wątroby są znacząco podwyższone w porównaniu do grupy kontrolnej. Uważa się, że miedź i ceruloplazmina mogą być markerami nowotworów wątroby. Stwierdzono, że suplementacja cynku zwiększa odporność komórkową i chroni organizm przed infekcjami i powstawaniem zmian nowotworowych.. Niedobór cynku w diecie wpływa na rozwój raka jelita grubego. Wykazano, że u kobiet z rakiem piersi poziom cynku był znacznie niższy niż u kobiet zdrowych zaś poziom miedzi i stosunek miedzi do cynku był istotnie podwyższony. Doświadczalnie wykazano, że poziom miedzi i cynku oraz ich stosunek jest przydatny do wykrywania wczesnego stadium nowotworów przewodu pokarmowego.

Celem pracy było określenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego oraz stężenie poziomu cynku u psów z nowotworami okolicy odbytu przed leczeniem i 1 oraz 6 miesięcy od rozpoczęcia leczenia.

Badane zwierzęta podzielono na dwie grupy: psy z nowotworami złośliwymi (carcinoma i epithelioma) i z nowotworami niezłośliwymi okolicy odbytu (adenoma).Zwierzęta były poddawane leczeniu zachowawczemu preparatami antyhormalnymi po wcześniejszym zbadaniu poziomu hormonów płciowych w surowicy krwi. Psy z podwyższonym poziomem estrogenów leczono Tamoxifenem w dawce 1 mg/kg. Psy z podwyższonym poziomem testosteronu leczono preparatem Androcur w dawce 5mg/kg. Surowica do badań była pobierana od psów trzykrotnie; przed leczeniem, 1 i 6 miesięcy od rozpoczęcia leczenia.

Materiał do oznaczeń stężenia cynku stanowiła surowica krwi 45 psów samców różnych ras. Psy były leczone zachowawczo w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z powodu nowotworów gruczołów okołoodbytowych. Wiek psów wahał się w granicach od 9 do 14 lat

Do oznaczenia całkowitego statusu antyoksydacyjnego w surowicy krwi użyto komercyjnego zestawu Im An Ox (TAS) Kit Immunodiagnostic AG Benscheing Germany. Absorbcję dla cynku oznaczano na spektrofotometrze absorpcji atomowej firmy PAY-UNICAM. W tym celu zastosowano lampę spektrofotometryczną cynkową. Lampa emituje światło o określonej długości fali, które jest pochłaniane proporcjonalnie do zawartości tego pierwiastka w próbce.

Uzyskane wyniki wykazują udział TAS w leczeniu nowotworów okolicy odbytu u psów. Poziom enzymów antyoksydacyjnych jest wyższy w surowicy psów z nowotworami złośliwymi niż z nowotworami niezłośliwymi. Różnica nie jest statystycznie istotna. Aktywność antyoksydacyjna wzrasta ze średniej aktywności przed leczeniem do wysokiej aktywności po pierwszym miesiącu leczenia, TAS po 6 miesiącach leczenia w surowicy psów z nowotworami złośliwymi obniża się w porównaniu do psów z nowotworami niezłośliwymi. Różnica jest istotna statystycznie. Spadek aktywności antyoksydacyjnej powoduje obniżenie efektywności leczenia przeciwnowotworowego. Być może suplementacja antyoksydantów takich jak selen i witamina C i E może wspomagać leczenie przeciwnowotworowe. W surowicy psów z nowotworami złośliwymi przed leczeniem koncentracja cynku jest bardzo niska. Podczas leczenia ilość cynku w surowicy wzrasta bardzo wyraźnie do granic norm fizjologicznych. Sugeruje to duże zapotrzebowanie guza na ten pierwiastek i gromadzenie w nim cynku. Potwierdzają to wyniki badań własnych poziomu cynku w surowicy i tkance nowotworów gruczołu sutkowego i skóry u psów. Badania te wykazały spadek stężenia cynku w surowicy a wzrost stężenia cynku w tkance nowotworowej gruczołów sutkowych.

Wzrost zapotrzebowania tkanki nowotworowej na cynk jest prawdopodobnie związany ze wzrostem metabolizmu komórki nowotworowej i wzrostem aktywności wielu enzymów wewnątrzkomórkowych uaktywnianych przez jony cynku. Stwierdzono również, że gromadzenie cynku wewnątrzkomórkowego hamuje apoptozę komórki nowotworowej. Wyniki powyższych badań opublikowano w pracy:

- Brodzki A., Brodzki P., Tatar MR, Kostro K.: Total antioxidative status and zinc concentration in dogs suffering from perianal tumors. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 47-52, 2013. (

### WNIOSKI:

1. Profil wolnych aminokwasów w surowicy krwi u psów z chorobą nowotworową posiada wartość diagnostyczną i stanowi uzupełnienie diagnostyki histologicznej nowotworów gruczołów okołoodbytowych.
2. Kształtowanie się poziomu magnezu w surowicy u psów leczonych preparatami antyhormonalnymi jest przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu skuteczności leczenia zachowawczego nowotworów okolicy okoła odbytovej.
3. Zawartość antygenu Ki-67 w tkance nowotworowej gruczołów okołoodbytowych ściśle koreluje ze stopniem złośliwości, co może być wykorzystane w diagnostyce różnicowej oraz w prognozowaniu skuteczności zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego.
4. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w surowicy psów z nowotworami złośliwymi jest istotnie wyższa w porównaniu do nowotworów niezłośliwych. Kształtowanie się aktywności antyoksydacyjnej po zastosowaniu leczenia przeciw hormonalnego szczególnie w odniesieniu do nowotworów złośliwych gruczołów okołoodbytowych jest wskazaniem do suplementacji antyoksydantami w celu zwiększenia skuteczności leczenia zachowawczego.
5. Niski poziomu cynku w surowicy psów z nowotworami złośliwymi jest wynikiem zwiększonego jego zapotrzebowania przez komórki nowotworowe ze względu na wzrost ich metabolizmu i aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych zależnych od stężenia jonów cynku.
6. Wzrost poziomu estradiolu powoduje jednoczesne zwiększenie poziomu czynnika wzrostu naczyń krwionośnych (VEGF), co jest przyczyną progresji procesu nowotworowego.

7. U psów terapia antyhormonalna jest bezpieczną i skuteczną metodą leczenia zachowawczego szczególnie w odniesieniu do nowotworów niezłośliwych gruczołów okołoodbytowych. Natomiast w przypadku nowotworów złośliwych celowe jest uzupełnienie postępowania resekcją zmian nowotworowych.

**Prace stanowią oryginalny element badań dotyczących prześledzenia odpowiedzi organizmu zwierząt poddanych leczeniu nowotworów okolicy odbytu preparatami antyhormonalnymi przez okres sześciu miesięcy.**

Piśmiennictwo::

1. Abadie J.J., Armardeilh M.A., Delverdier M.E., Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dog. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1999, 215, 1629 – 1634.
2. Aijun L, Lezhen Ch, Ngan H et al.: Apoptotic and proliferative activity in ovarian benign, borderline and malignant tumors. Chin Med Sci J. 2002, 17, 106-111.
3. Bast A., Haenen G.R.M.M.: The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environ Toxicol. Pharmacol., 2002, 11, 251-258.
4. Beck T., Weller E.E., Weikel W., Brumm C., Wilkens C., Knapstein P.G. 19. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. Gynecol Oncol. 1995, 57 (1), 96–104.
5. Bostedt H., Tammer I.: Kasuistischer Beitrag zur Prognose bei Mammatumoren des Hundes. Prakt. Tierarzt 1995, 76, 921-924.
6. Bray J.: Tumours of the perianal region. BSAVA Manual of Canine and feline Oncology, 3<sup>rd</sup> edition. Edited: Dobson J.M and Lascelles B.D.X. 2011, 223-228.
7. Burdzińska A., Idziak M.: Nowotwory gruczołów okolicy odbytu u psów. Magazyn Wet. 2008, 16, 1130-1134.



8. Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berlinger G.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J. Immunology*, 1942, 45, 159-170.
9. Dietrich D.R.: Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993, 23, 77-109.
10. Esteva F.J., Hortobagyi G.N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2004, 6, 109-118.
11. Ferguson L.R.: Role of plant polyphenoles in genomic stability. *Mutation Res.*, 2001, 475, 89-111.
12. Finnie JW., Bostock DE.: Skin neoplasia in dogs. *Aust. Vet. J.* 1979, 55, 602-604.
13. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992, 3, 65-71.
14. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971, 285, 1183-1186.
15. Frese K., Durchfeld B., Eskens U.: Klassifikation und biologisches Verhalten der Haut - und Mammatumoren von Hund und Katze. *Prakt. Tierärz* 1989, 9, 69-84.
16. Frigerio L, Agnello A, Sassi I et al.: Adjuvant role of MIB-1 in differentiating serous ovarian tumors – preliminary report. *Anticancer Research* 1997, 17, 1287-1292.
17. Ghazizadeh M., Sasaki Y., Araki T., Aihara K. Prognostic value of proliferative activity of ovaria carcinoma as revealed by PCNA and agNOR analyses. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1997, 107, 451-458.
18. Goldschmidt M.H., Dunstan R.W., Stannard A.A., von Tscharnner C., Walder E.J., Yager J.A.: Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. WHO International histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2<sup>nd</sup> series, vol. III, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1998.
19. Goldschmidt M.H., Shofer F.S.: Skin tumors of the dog and cat. Pergamon Press, Oxford 1992, p.66.
20. Goldschmidt, M. and Hendrick, M.: Tumours of the skin and soft tissue. In: Tumors in Domestic Animals, 4th Edit., D. Meuten, Ed., Iowa State Press, 2000, pp. 68e70.

21. Goodson W.H.III., Moore Dan H.II., Ljung B.M., Chew K., Mayall B., Smith H.S., Waldman F.M. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vitro bromodeoxyuridine and Ki-67. *Brest cancer Res. Treat.*, 2000, 59, 113-123.
22. Harvey J.M., Clarc G.M., Osborne C.K., Allred D.C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. 1999, 17, 1474-1481.
23. Heinlein C.A., Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Rev.* 2004, 25, 276-308.
24. Jakab C., Rusvai M., Glif P., Kulka J.: Expression of Claudin-7 Molecule in Canine Perianal Gland Tumours. *Acta Vet. Brno* 2010, 79, 127-133.
25. Kessler M.: *Kleintieronkologie*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin-Wien 1999.
26. Kupiel M., Bostock D., Bergmann V. The prognostic significance of Ag NOR count and PCNA-positive cell count in canine malignant lymphomas, *J. Comp. Pathol.*, 1998, 74, 64-76.
27. Laprie K., Abadie J., Amardeilh M., Net.J., Lagadic M., Delverdier M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behavior in canine cutaneous melanoma. *Vet. Dermatology*, 2001, 12, 139-147.
28. Jensen T., The prognostic value of oncogenic antigen 519 (OA-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer. *J. Pathol.* 1995, 176 (4), 343-35.
29. Maita K., Ishida K.: Structure and development of the perianal gland of the dog. *Jap. J. Vet. Sci.* 37, 349-356, 1975.
30. Malicka E., Piusiński W., Sendecka H., Bielecki W., Osińska B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Nowotwory psów stwierdzone w badaniach anatomopatologicznych w latach 1985-1993. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 103-106.
31. MARTINS A.M., VASQUES-PEYSER A., TORRES L.N., MATERA J.M., DAGLI M.L., GUERRA J.L. 2008. Retrospective – systematic study and quantitative analysis of cellular proliferation and apoptosis in normal hyperplastic and neoplastic perianal glands in dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 6, 71-79
32. Meleo K.A.: Tumors of the skin and associated structures. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1997, 1, 73-94.
33. Millán Y., Guil-Luna S., Reymundo C., Sánchez-Céspedes R., Martín de las Mulas J. Chapter 7: Sex Steroid Hormones and Tumors in Domestic Animals. *Insights from Veterinary Medicine Intech* 2013.

34. Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I., Poli A. Comparison of steroid receptors expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.*, 2005, 79, 225-232.
35. Morris J., Dobson J.: *Small animal oncology*. Blackwell Science Ltd. London 2001.
36. Morrison W.: *Cancer in dogs and cats*. Lippincott Williams & Wilkins, USA 1998.
37. Munksgaard PS, Blaakaer J: The association between endometriosis and ovarian cancer: A review of histological, genetic and molecular alteration. *Gynecol Oncol* 2012; 124: 164-169.
38. Nielsen S.W.: Classification of tumors in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 1983, 19, 13-15.
39. Nolte I., Nolte M.: *Practical oncology in dog and cat*. Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart 2000.
40. Nolte I., Nolte M.: *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze*. Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart 2000.
41. Offersen B.V., Sørensen F.B., Knoop A., Overgaard J.13. : Danish Breast Cancer Cooperative Tumour Biology Committee: The prognostic relevance of estimates of proliferative activity in early breast cancer. *Histopathology*, 2003, 43 (6), 573–582.
42. Park C, Yoo JH, Kim HJ, Lim CY, Kim JW, Lee SY, Kim JH, Jang JI, Park HM.: Cyclosporine treatment of perianal gland adenoma concurrent with benign prostatic hyperplasia in a dog. *Can. Vet. J.* 2010, 51, 1279-82.
43. Pinder S.E., Wencyk P., Sibbering D.M., Bell J.A., Elston C.W., Nicholson R. et al: Assessment of the new proliferation marker MIB-1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br. J. Cancer*. 1995, 71 (1), 146–149.
44. Petruzelli G. The biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. *ORL* 2000; 62: 178-185.
45. Pich A., Chiusa L., Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *A. Oncol.*, 2004, 15, 1319-1329.
46. Pisani G., Millanta F., Lorenzi D., Vannozzi I., Poli A.: Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. *Res. Vet. Sci.* 81, 231-236, 2006.

47. Roels S., Tilmant K., Ducatelle R. PCNA and Ki-67 proliferation markers as criteria of clinical behavior of melanocytic tumors in cats and dogs. *J. Comp. Path.*, 1999,121, 13-24.
48. Shabadash SA and Zelikina TI . The sex dimorphism of the hepatoid circumanal glands in the dog and the dynamics of its development. *Izvestia Akademii Nauk Seria Biologicheskaja* 1995, 5, 590-605.9 (17).
49. Shur Y-J.: Molecular mechanisms of chemo-preventive effects of selected dietary and medicinal
50. Sylvia MT, Kumar S, Dasari P: The expression of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2-neu, p53 and Ki 67 in epithelial ovarian tumors and its correlation with clinicopathologic variables. *Indian J Pathol Microbiol* 2012, 55, 33-37.
51. Szaflarska-Stojko E.: Morfologia i statystyka nowotworów psów na terenie Katowic ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów skóry. *Medycyna Wet.* 1970, 26, 20-22.
52. Szala S, Radzikowski Cz. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997, 47, 1-5.
53. Spyrtatos F., Ferrero-Poüs M., Trassard M., Hacène K., Phillips E., Tubiana-Hulin M. et al Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*, 2002, 94 (8), 2151–215.
54. Taylor C.R., Burns J.: The demonstration of plasma cell and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J. Clin. Pathol.* 1974, 27, 14-20.
55. Tozon N, Kodre V, Juntas P, Sersa G., Cemazar M., "Electrochemiotherapy is highly effective for the treatment of canine perianal hepatoid adenoma i epithelioma". *Acta Veterinaria* 2010, 60, 285-302.
56. Tozon N., Kodre V. Sersa G., Cemazar M.: Effective Treatment of Perianal Tumors in Dogs with Electrochemotherapy. *Anticancer Res.* 2005, 25, 839-846.
57. Tunc AS., Alcigir ME., Atalay – Vural S., Concurrent metastatic hepatoid gland carcinoma and oesophagogastric leiomyosarcoma in a dog. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2014, 61, 29-34.
58. White R. A. S.: *Manual of small oncology.* B.S.A.V.A.1995.

59. Wilson GP, Hayes HM. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1979, 174, 1301-1303.
60. Withrow S.J., MacEwen E.G.: Small animal clinical oncology. W.B. Saunders Company 1996.
61. Wolf FI, Trapani V. Magnesium and its transporters in cancer: a novel paradigm in tumour development. Clin. Sci. 2012, 123, 417-427.
62. Wu MH, Wang CA, Lin CC et al.: Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 beta in normal and endometriotic stromal cells. J Clin Endocrinol Metab 2005, 90, 286-295.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych**

Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w 1995 roku zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt. pod kierownictwem prof. dr hab. Edwarda Komara.

Pierwszy okres mojej pracy naukowo-badawczej i klinicznej obejmował zapoznanie się z technikami diagnostycznymi i terapeutycznymi wykorzystywanymi w rozpoznawaniu i leczeniu chorób chirurgicznych u zwierząt oraz ich zastosowaniem w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Jednocześnie pracując, jako lekarz w Klinice, rozpocząłem badania nad wybranymi chorobami nowotworowymi u psów, których wyniki przedstawiłem w pracy doktorskiej.

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora odbyłem krótkoterminowy staż: na Uniwersytecie w Koszycach, gdzie zapoznałem się z technikami leczenia chirurgicznego u zwierząt, z metodami pracy dydaktycznej ze studentami anglojęzycznymi oraz z metodami badań w onkologii weterynaryjnej.

Efektom prowadzonych badań i obserwacji poczynionych w tym czasie są publikacje, które ukazały się drukiem przed uzyskaniem tytułu doktora nauk weterynaryjnych:

1. Silmanowicz P., **Brodzki A.**: Dostępny chirurgiczne do stawu biodrowego u psa. *Magazyn Wet.* 2001, 61, 24-31.
2. Komar E., **Brodzki A.**: Seminoma i Sertolioma jako powikłanie wnetrowstwa u psa. *Materiały II międzynarodowej konf. Nauk pt.: onkologia małych zwierząt – stan obecny i perspektywy.*
3. **Brodzki A.**, Pasternak K., Silmanowicz P.: Magnez w tkance nowotworów złośliwych łagodnych skóry u psów. *Materiały VI Lubelskiej Środowiskowej Konferencji Magnezologicznej pt. „Pierwiastki – fizjologiczne i patologiczne aspekty ich niedoborów i nadmiarów „Lublin, maj, 2002*
4. **Brodzki A.**, Sztanke M., Pasternak K., Silmanowicz P.: Stężenie magnezu a poziom aminokwasów zasadowych w surowicy psów z nowotworami gruczołu mlekowego. *Materiały VI Lubelskiej Środowiskowej Konferencji Magnezologicznej pt. „Pierwiastki – fizjologiczne i patologiczne aspekty ich niedoborów i nadmiarów” Lublin, maj, 2002.*

W 2000 roku nawiązałem współpracę naukową z Prof. dr hab. Kazimierzem Pasternakiem kierownikiem Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej UM w Lublinie. W wyniku kilkuletniej współpracy wykonałem badania składu makro i mikroelementów oraz zawartości wolnych aminokwasów surowicy i tkance nowotworowej skóry i gruczołu sutkowego u psów chorych na te nowotwory.

Zakończeniem tego etapu mojej działalności naukowej było uzyskanie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w 2003 roku stopnia doktora nauk weterynaryjnych na podstawie pracy: „Wolne aminokwasy , oraz magnez, miedź i cynk w nowotworach skóry, tkanki podskórnej i gruczołu sutkowego u psów.” Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. dr habil. Piotr Silmanowicz.

### **5.3. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych.**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w 6 publikacjach naukowych w czasopismach z listy A MNiSZW.

Prace oryginalne:

1. **Brodzki A**, Pasternak K., Balicki I., Brodzki P., Szponder T., Tatar M.R.: Wolne aminokwasy w nowotworach gruczołu sutkowego u psów. *Med. Weter.* 2004 Vol. 60 Nr 9, s. 937-941.

2. **Brodzki A.**, Szponder T., Pasternak K., Sztanke M.: Magnesium in tumours of the dogs' skin. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2004 Vol. 48 No. 3, s. 317-320.
3. **Brodzki A.**, Pasternak K., Sztanke M., Brodzki P., Szponder T. Magnesium Concentration in Mammary Tumours in Dogs. Magnesium Res. 2004, 17, 2, 79-84.
4. **Brodzki A.**, Tataro M.R., Pasternak K., Różańska D., Szponder T.: Free amino acids in skin neoplastic tissues and serum in dogs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2005 Vol. 49 No. 2, s. 231-235.
5. **Brodzki A.**, Tataro M.R.: Copper and zinc concentration in mammary gland tumor tissue of dogs Pol. J. Environ. Stud. 2007 Vol. 16 No 3A.
6. **Brodzki A.:** Copper and zinc concentration in skin neoplastic tissues in dogs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2007 Vol. 51 No. 2, s. 271-273.

Oprócz swojego zainteresowania dotyczącego choroby nowotworowej u psów, które rozwijałem po uzyskaniu stopnia doktora brałem czynny udział we wspólnych badaniach prowadzonych w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt, obejmujących takie zagadnienia jak:

- 1 ocena działania środków wykorzystywanych w anestezjologii zwierząt domowych, ich wpływ na układ krążenia i oddychania oraz na parametry funkcji wątroby,
2. chirurgiczne leczenie urazów u małych zwierząt,
3. postępowanie chirurgiczne w złamaniach kości u zwierząt.

Efektem tej działalności klinicznej i naukowej były artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie punktowanych oraz popularyzatorskich, dla lekarzy weterynarii praktyków.

1. **A. Brodzki., W. Łopuszyński, R. Komsta., M. Orzelski., I. Balicki.** Die Beurteilung der Ergebnisse in der Therapie sowie Analyse des Therapieverlaufs der malignen Tumoren der Zehen beim Hund. Tierärztliche Umschau 2004, **59**, 594-600.
2. Szponder T., Balicki I., Polkowska I., **Brodzki A.**, Różańska D., Orzelski Zastosowanie stabilizatora Ilizarowa w leczeniu złamań kości długich u małych zwierząt- wyniki badań klinicznych 1997-2003.. Medycyna Wet. 2004, **60**, 500-503.
3. Wojciech Łopuszyński, Renata Komsta, **Adam Brodzki**, Maciej Orzelski. Nowotwory łożyska pazura u psów. Magazyn Wet. 2005, 14, 3, 4-6.
4. Tomasz Szponder, **Adam Brodzki**, Maciej Orzelski, Izabela Polkowska.: Zastosowani kleju fibrynowego w praktyce chirurgicznej. Magazyn Wet. 2006, 15, 1, 8.
5. Balicki I., Różańska D., Ćwiek A., Silmanowicz P., Szponder T., **Brodzki A.** Krótkotrwałe znieczulenie psów przy urzyciu midazolamu i ksylazyny. Medycyna Wet. 2007, 63, 72-74.
6. Mochon J., **Brodzki A.**, Kurek Ł., Orzelski M., Stec A.:Przemieszczenie jelita biodrowego u zrebnięcia-rozpoznanie i terapia. Medycyna Wet. 2007, 63, 344-347.

7. Łojarczyk – Szczepaniak A., **Brodzki A.**, Żylińska B. Ciało obce w pęcherzu moczowym psa - radiologiczny obraz przypadku. [Mag. Wet. 2012 Vol. 21 nr 178, s. 230-234.

8. Polkowska I., **Brodzki A.** Złamanie żuchwy u konia w okolicy siekaczy.. Mag. Wet. 2008 Vol. 17 nr 6, s. 686-687

9. **Brodzki A.**, Silmanowicz P., Brodzki P., Dębiak P. Chirurgische Behandlung eines Fremdkörpers im zervikalen Teil des Ösophagus eines Hundewelpen. Tierärztl. Umsch. 2011 Vol. 66 No. 6, s. 258-261.

Poza badaniami prowadzonymi w Klinice Chirurgii Zwierząt brałem aktywny udział w badaniach we współpracy z pracownikami z Kliniki Rozrodu Zwierząt. Początkowo badania dotyczyły cyklofosfamidu i tamoxifenu, chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu zmian nowotworowych u psów. Choroby nowotworowe w praktyce weterynaryjnej małych zwierząt stanowią poważny problem. Leczenie nowotworów, oparte jest głównie na stosowaniu preparatów cytostatycznych - hamujących szybko proliferację komórek nowotworowych. Chemioterapia zalecana jest zarówno w przypadku guzów operacyjnych jak i takich, których chirurgiczne usunięcie w całości jest niemożliwe. Stosowane preparaty cytostatyczne są bardzo często toksyczne a ich oddziaływanie nie jest wybiórcze i ograniczone jedynie do tkanki nowotworowej. Najbardziej narażone na negatywne skutki chemioterapii są te tkanki organizmu, w których zachodzą szybkie podziały komórkowe, takie jak szpik kostny czy nabłonek plemnikotwórczy w kanalikach nasiennych jąder.

W celu sprawdzenia ubocznych skutków stosowania chemioterapii, wspólnie z Katedrą i Kliniką Rozrodu Zwierząt Wydziału Med. Wet. UP w Lublinie przeprowadzono badania polegające na ocenie wybranych wskaźników płodności oraz wybranych parametrów odporności, u psów samców z nowotworami skóry i tkanki podskórnej po zastosowaniu preparatów o działaniu cytostatycznym (tamoxifen oraz cyclophosphamid).

Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowany w badaniach własnych tamoksifen, w ogólnie przyjętych dla psów dawkach terapeutycznych, wywierał negatywny wpływ na funkcję układu rozrodczego psów samców powodując, początkowo już w pierwszym tygodniu jego stosowania, pogorszenie się, jakości większości ocenianych parametrów nasienia, a w późniejszym czasie, od drugiego tygodnia jego stosowania, aspermię świadczącą o całkowitej utracie płodności samca. Utrata płodności okazała się okresowa i trwała około 60 dni. Po tym czasie samce odzyskiwały zdolność produkcji ejakulatu jednak o bardzo osłabionej, jakości która w późniejszym czasie ulegała sukcesywnej poprawie.



Zastosowany w badaniach własnych cyklofosamid, również prowadził do obniżenia wskaźników jakości nasienia, zarówno podczas jak i po zakończeniu jego podawania. Objawiało się to, nieznacznym obniżeniem objętości nasienia, obniżeniem odsetka plemników wykazujących prawidłowy ruch indywidualny, podwyższeniem ilości plemników martwych oraz z uszkodzoną błoną komórkową, a także znacznym obniżeniem koncentracji plemników w ejakulacie. W badaniach własnych obserwowano jedynie pogorszenie się, jakości ejakulatu a obecność plemników świadczyła o ciągle aktywnym procesie spermatogenezy. Przeprowadzone przez autorów badania potwierdzają ponadto niekorzystny wpływ preparatów o działaniu cytostatycznym na większość ocenianych parametrów odporności komórkowej u psów. Zastosowane w doświadczeniu preparaty różnią się zasadniczo swoim mechanizmem działania, co ma odzwierciedlenie w wynikach. Tamoksifen jako antyestrogen wpływa immunosupresyjnie po dłuższym okresie jego stosowania, początkowo może nawet podwyższać odporność komórkową u psów. Cyclofosamid jest bardziej toksyczny a jego działanie obniżające odporność jest o wiele silniejsze i widoczne już po krótkim okresie stosowania. Informacje te są istotne przy terapii cytostatykami i doborze odpowiedniego preparatu oraz ewentualnej terapii wspomagającej, łagodzącej negatywne oddziaływanie wymienionych cytostatyków.

Ponadto we współpracy z pracownikami Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt oraz pracownikami z Katedry i Kliniki Epizootologii Zwierząt uczestniczyłem w badaniach nad patologicznymi zmianami w macicy krów po porodzie. W tym okresie u krów zmiany chorobowe obejmowały przewód pokarmowy, wymagające często leczenia operacyjnego (skręt trawieńca) oraz patologie w obrębie macicy. Te problemy okresu poporodowego u krów spowodowały zainicjowanie wspólnych badań Zapalenie macicy w stadach krów mlecznych stanowi w dalszym ciągu poważny problem ekonomiczny na całym świecie. Największe straty przynoszą koszty leczenia zapalenia macicy, niski wskaźnik inseminacji a często nawet konieczność brakowania zwierząt ze stada, w wyniku niepłodności. Stan zapalny macicy może powodować upośledzenie funkcji endometrialnych, co uniemożliwia zapłodnienie, implantację zarodka a nawet może prowadzić do wczesnych poronień. Ponadto zapalenie macicy może być przyczyną zaburzeń cyklu jajnikowego, obejmujących tworzenie się torbieli jajnikowych, przedłużenie fazy lutealnej oraz opóźnione pojawienie się pierwszej pełnowartościowej rui po porodzie. W konsekwencji wydłuża się okres potrzebny do powrotu cyklicznej aktywności jajników, a tym samym występuje pogorszenie parametrów rozrodu.

W złożonej etiologii zapalenia macicy ważną rolę odgrywają infekcje bakteryjne. Wśród których najczęściej izoluje się *Escherichia coli* oraz *Trueperella pyogenes* współdziałające z bakteriami beztlenowymi takimi jak *Fusobacterium necrophorum* i *Prevotella melaninogenicus*. Podstawową rolę w zwalczaniu infekcji macicy odgrywają komórkowe i humoralne mechanizmy nieswoistej i swoistej miejscowej odporności przeciwzakaźnej macicy. Pierwszą linię obrony, poza komórkami nabłonka

endometrium stanowią wyspecjalizowane komórki fagocytarne. Rolę „profesjonalnych” fagocytów pełnią neutrofile i makrofagi, które pokonują barierę krew-endometrium i wnikają do macicy, pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki endometrium oraz obecne stale w macicy leukocyty. Zadaniem tych komórek jest nie tylko usuwanie obcych substancji i drobnoustrojów, które przedostały się w głąb macicy, ale również likwidacja zużytych własnych tkanek.

Podczas wspólnie wykonanych badań ustalono, że u krów w czasie występowania zapalenia macicy, większość z wybranych parametrów lokalnego statusu immunologicznego macicy jest istotnie niższa w porównaniu do krów zdrowych, co może świadczyć o osłabionej odporności macicy w przebiegu stanu zapalnego tego narządu.

Bardzo podobne jednak o wiele bardziej zaawansowane osłabienie lokalnych mechanizmów odporności zaobserwowano u krów mlecznych, podczas występowania ropomacicza.

Badania podejmowały próbę znalezienia statusu immunologicznego krów chorych oraz podnoszenia odporności przez immunomodulację organizmu chorej krowy jak i samej macicy objętej procesem patologicznym. Wynikiem współpracy były następujące publikacje:

#### Prace oryginalne:

1. Brodzki P., Wrona Z., Krakowski L., **Brodzki A.**. Influence of tamoxifen on sexual impulse and semen biological values in male dogs Bull. Vet. Inst. Pulawy 2007 Vol. 51 No. 3, s. 383-391.
2. Brodzki P., Wrona Z., Piech T., **Brodzki A.**.: Effects of cytostatics on the selected parameters of cell-mediated immunity in dogs Bull. Vet. Inst. Pulawy 2011 Vol. 55 No. 1, s. 87-93.
3. Brodzki P., Wrona Z., Krakowski L., Łopuszyński W., **Brodzki A.**.: Wpływ cyclofosfamidu na wartość wybranych parametrów nasienia u psów. Medycyna Wet. 63, 439-443, 2007
4. Brodzki P., M. Bochniarz, **A. Brodzki**, Z. Wrona, W. Wawron. 2014 *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* as an aetiological factor of endometritis in cows and the susceptibility of these bacteria to selected antibiotics. Polish J. V. Sci. 4, 657 - 664.
5. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Lisiecka U, 2014: Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis. Anim Reprod Sci 148, 109-114.

7. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Lisiecka U, Kurek Ł, Marczuk J, 2014: Phenotyping of leukocytes and granulocyte and monocyte phagocytic activity in the peripheral blood and uterus of cows with endometritis. *Theriogenology* 82, 403-410.
8. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Wawron W, Kurek Ł, Marczuk J, 2015: Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology* 84, 11-18.
9. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Niemczuk K, Lisiecka U, 2014: Cytometric analysis of surface molecules of leukocytes and phagocytic activity of granulocytes and monocytes/macrophages in cows with pyometra. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 858-864.
10. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Ziętek J: 2015 The concentrations of inflammatory cytokines and acute-phase proteins in the peripheral blood and uterine washings in cows with pyometra. *Reprod Dom Anim.* 50, 417 - 422.
11. Brodzki P, Niemczuk K, Kostro K, **Brodzki A**, Kurek Ł, Marczuk J. 2014 Cytological evaluation of inflammation of the uterus and influence of endometritis on selected reproductive parameters in dairy cows. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 58, 235-242.
12. Brodzki P, **Brodzki A**, Kurek Ł, Marczuk J, Tatar MR. 2015 Reproductive system condition in dairy cows with left-sided displacement of the abomasums. *Ann. Anim. Sci.* 15, 359 - 371.
13. Brodzki P, Kostro K, **Brodzki A**, Kurek Ł, Marczuk J, Krakowski L. 2014 Cytological image of the endometrium in cows in follicular and luteal phases of the ovarian cycle and in cows with follicular and luteal cysts. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 58, 141-147.
14. Brodzki P, **Brodzki A**, Kurek Ł, Marczuk J, Tatar MR: 2015 Endometrial cytology at luteal and follicular phases of the ovarian cycle in cows. *Ann. Anim. Sci.* 15, 107 - 117.

Współpracowałem także z dr hab. Marcinem R. Tatarą (Katedra Fizjologii Zwierząt) w prowadzeniu badań wytrzymałościowych kości różnych gatunków zwierząt oraz wpływu leków steroidowych na parametry fizyczne kości. Były one dla mnie ważne ze względu na walory poznawcze i aspekty aplikacyjne. Realizacja powyższej tematyki badawczej pozwoliła mi na poznanie własności morfologicznych i mechanicznych oraz gęstości mineralnej kości szkieletu obwodowego różnych

gatunków ptaków i ssaków. Badania te zostały przeprowadzone na różnych gatunkach ptaków wolno żyjących oraz na ptakach hodowlanych. Określono również własności układu szkieletowego psów, świń i owiec. W badaniach nad układem szkieletowym rosnących indyków wykazano istnienie korelacji między objętościową gęstością mineralną, parametrami morfologicznymi i własnościami mechanicznymi kości piszczelowej, co dało możliwość praktycznego wykorzystania techniki tomografii komputerowej jako nieinwazyjnej metody oceny jakości szkieletu w warunkach *in vivo*. Technikę tomografii komputerowej wykorzystano do badań nad regulacją metabolizmu tkanki kostnej przez czynniki fizjologiczne, żywieniowe, farmakologiczne i toksykologiczne. Na modelu owcy wykazano wzajemną korelację własności morfologicznych kości udowej oraz końcowej masy ciała owiec, co sugeruje, że rozwój układu szkieletowego może determinować masę ciała tych zwierząt. Badania wskaźnika korowotrzonowego kości udowej u psów w różnym wieku wykazały użyteczność tego parametru do oceny jakości układu szkieletowego, co może być wykorzystywane w podstawowych badaniach poznawczych i diagnostycznych.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń udokumentowano także korzystne efekty oddziaływania alfa-ketoglutaranu (AKG) podawanego z karmą na własności tkanki kostnej u ptaków i ssaków. Wykazano, iż AKG zwiększa gęstość mineralną kości oraz parametry określające własności morfologiczne i wytrzymałość mechaniczną kości. Uzyskane efekty pozytywnego oddziaływania AKG na metabolizm tkanki kostnej zaobserwowano zarówno w obrębie kości gąbczastej jak i kości korowej. Ponadto wyniki tych badań wskazują na potencjalną możliwość stosowania AKG w profilaktyce i leczeniu chorób metabolicznych kośćca u ludzi dorosłych i zaawansowanym wieku powiązanych z osteoporozą, która współcześnie jest jedną z najbardziej uciążliwych chorób cywilizacyjnych.

W badaniach nad wpływem deksametazonu i AKG na poziom wybranych hormonów we krwi noworodków prosiąt wykazano, iż podawanie AKG łącznie z deksametazonem ciężarnym maciorom przez ostatnie 24 dni ciąży powoduje wzrost koncentracji hormonu wzrostu (GH). Prenatalne oddziaływanie AKG spowodowało także wzrost koncentracji kortyzolu i insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF-1) w surowicy krwi noworodków prosiąt. Wyniki tych badań wyjaśniają jeden z mechanizmów anabolicznych efektów AKG na rozwój układu szkieletowego zwierząt obserwowany w życiu postnatalnym.

Wynikiem tej współpracy były następujące publikacje:

1. Tataro M.R., Pierzynowski S.G., Majcher P., Krupski W., **Brodzki A.**, Studziński T. Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) on mineralisation, morphology and mechanical endurance of femur

- and tibia in turkey. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 48, 305-309, 2004, Pkt.=10; IF=0,192.
2. Tataro M.R., **Brodzki A.**, Krupski W., Śliwa E., Silmanowicz P., Majcher P., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effect of alpha-ketoglutarate (AKG) on bone homeostasis and plasma amino acids in turkeys. Poultry Science 84,1604-1609, 2005, (IF – 1,747; Pkt. MNiSW – 24).
  3. Tataro M.R., Śliwa E., Krupski W., **Brodzki A.**, Pasternak K.: Ornithine alpha-ketoglutarate increases mineralization and mechanical properties of tibia in turkeys. Bone 39,100-105, 2006 (IF – 3,829; Pkt. MNiSW – 20).
  4. Tataro M.R., **Brodzki A.**, Pasternak K., Szpetnar M., Rosenbeiger P., Tymczyna B., Niedziela D., Krupski W.: Changes of amino acid concentrations in Polish Merino sheep between 21 and 150 days of life. Vet. Med. 59, .68-75, 2014 **PUNKTY**
  5. Tataro M.R., **Brodzki A.**, Pyz-Łukasik R., Pasternak K., Szpetnar M.: Sex-related differences in skeletal muscle amino acid concentrations in 20 week old turkeys. Poult. Sci.: 49, 219-223.
  6. Tataro M.R., **Brodzki A.**, Krupski W., Śliwa E., Silmanowicz P., Majcher P., Pierzynowski S.G., Studziński T.: Effects of alpha-ketoglutarate on bone homeostasis and plasma amino acids in turkeys. Poultry Sci.: 84 1604-1609, 2005
  7. **Brodzki A.**, Silmanowicz P., Tataro M.R., Brodzki P., Orzelski M.: Zastosowanie wskaźnika korowotrzonowego (WKT) kości udowej psów do oceny zmian właściwości mechanicznych i geometrycznych układu kostnego. Med. Wet.: 60, 1056-1060, 2004

8. **Brodzki Adam**, Tatara MR., Pasternak Kazimierz, Sztanke Małgorzata, Silmanowicz Piotr, Krupski Witold. Serum concentration of calcium, magnesium, copper and zinc in sheep treated with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) during the first 21 days of neonatal life.. *Pol. J. Environ. Stud.*: 17 . 46-49, 2000

Adam Brodzki