



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt

mgr inż. Marta Marynowska

**WYKORZYSTANIE TECHNIK
PROTEOMICZNYCH DO OCENY WPLYWU
DIETY Z RÓŻNYM UDZIAŁEM FRUKTANÓW
TYPU INULINOWEGO NA ZMIANY PROFILU
BIAŁKOWEGO AORTY U ROSNĄCYCH PROSIĄT**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Fizjologii, Cytobiologii
i Proteomiki

pod kierunkiem

**dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo,
prof. ZUT**

Spis treści

Wykaz skrótów	4
Streszczenie	8
1. Wstęp	12
2. Przegląd piśmiennictwa	14
2.1 Budowa i funkcje układu tętniczego.....	14
2.1.1. Budowa i rola aorty.....	16
2.2. Proteomika	17
2.2.1. Strategie proteomiczne w badaniu czynności układu sercowo – naczyniowego	20
2.2.2. Świnia jako organizm modelowy w badaniach proteomicznych.....	27
2.3. Inulina	30
2.3.1 Wpływ fruktanów typu inulinowego na fizjologię różnych tkanek u zwierząt i ludzi	32
3. Cel pracy	40
3.1. Hipoteza badawcza	40
4. Materiał i metody	41
4.1. Materiał badawczy	41
4.2. Dieta eksperymentalna.....	41
4.3. Rozdział białek z użyciem elektroforezy dwukierunkowej.....	43
4.3.1. Homogenizacja tkanki aorty	43
4.3.2. Ogniskowanie izoelektryczne (IEF – ang. <i>isoelectric focusing</i>)	43
4.3.3. Rozdział białek według masy molekularnej (SDS – PAGE).....	44
4.4. Detekcja białek na żelach 2-D oraz archiwizacja żeli	44
4.5. Analiza bioinformatyczna żeli 2-D.....	45
4.6. Identyfikacja spotów białkowych za pomocą spektrometrii masowej MALDI – TOF.....	45
4.7. Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych białek	46
4.8. Oznaczenia cholesterolu i trójglicerydów tkanki aorty	47
4.9. Analiza statystyczna wyników.....	47
5. Wyniki	48
5.1. Profil białkowy aorty rosnących prosiąt	48
5.2. Analiza zmian ekspresji białek aorty rosnących prosiąt.....	59
5.3. Wskaźniki biochemiczne aorty	63
6. Dyskusja.....	65
6.1. Analiza zmian ekspresji białek po zastosowaniu diety suplementowanej fruktanami typu inulinowego.....	77

7. Podsumowanie	88
8. Wnioski	90
9. Bibliografia	91
ANEKS	117
Wykaz tabel	130
Wykaz rysunków	131

Wykaz skrótów

- 2D PAGE – elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakrylamidowym (ang. *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*)
- 2DE – elektroforeza dwukierunkowa (ang. *two dimensional electrophoresis*)
- AAT – alfa-1 antytrypsyna (ang. *alpha-1 antitrypsin*)
- ACTA2 – alfa aktyna 2 (ang. *actin alpha 2*)
- ACTB – aktyna cytoplazmatyczna 1 (ang. *actin cytoplasmic 1*)
- ACTR3 – białko 3 związane z aktyną (ang. *actin-related protein 3*)
- AHSG – alfa-2-HS-glikoproteina, fetuina A, (*alpha-2HS-glycoprotein, fetuin A*)
- Akt1 – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*)
- ALDH2 – mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa (ang. *aldehyde dehydrogenase, mitochondrial*)
- Angpt2 – angiopoetyna 2 (ang. *angiopoethin 2*)
- ANXA1 – aneksyna A1 (ang. *annexin A1*)
- ANXA2 – aneksyna A2 (ang. *annexin A2*)
- APOA1 – apolipoproteina A1 (ang. *apolipoprotein A1*)
- APOA2 – apolipoproteina A2 (ang. *apolipoprotein A2*)
- ApoE – Apolipoproteina E (ang. *apolipoprotein E*)
- ASMCs – tętnicze komórki mięśni gładkich (ang. *arterial smooth muscle cells*)
- BPM – uderzenia na minutę (ang. *beats per minute*)
- CALR – kalretikulina (ang. *calreticulin*)
- CALU – kalumenina (ang. *calumenin*)
- CAVIN1 – białko związane z kaweolami 1 lub polimeraza I i czynnik uwalniania transkryptu (PTFR) (*caveolae-associated protein 1, polymerase I and transcript release factor*)
- CES-1 – karboksyoesteraza wątrobowa (ang. *carboxylesterase 1*)
- CLU – klasteryna (ang. *clusterin*)
- CNN – kalponina (ang. *calponin*)
- COL18A1 – łańcuch kolagenu alfa-1 (XVIII) (ang. *collagen alpha-1(XVIII) chain*)
- COL1A1 - łańcuch kolagenu alfa-1 (I) (ang. *collagen alpha-1(I) chain*)
- COL1A2 - łańcuch kolagenu alfa-2 (I) (ang. *collagen alpha-2(I) chain*)
- COL6A1 – łańcuch kolagenu alfa-1 (VI) (ang. *collagen alpha-1(VI) chain*)
- COL6A2 - łańcuch kolagenu alfa-2 (VI) (ang. *collagen alpha-2(VI) chain*)

COST – Europejski Program Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (ang. *European Cooperation in Science and Technology*)

CRP – białko C-reaktywne (ang. *C-reactive protein*)

CSRP2 – cysteina i bogate w glicynę białko 2 (ang. *cysteine and glycine-rich protein 2*)

CV – współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*)

DP – stopień polimeryzacji (ang. *degree of polymerization*)

ECGF1 – czynnik wzrostu śródbłonna komórkowego pochodzenia płytkowego (ang. *platelet-derived EC growth factor1*)

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)

EFEMP1 – fibulina 3 (ang. *fibulin-3*)

ELR – receptor dla elastyny i lamininy (ang. *elastin-laminin receptor*)

eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*)

FFAR2 – receptor wolnych kwasów tłuszczowych (ang. *free fatty acid receptor 2*)

FFAR3 – receptor wolnych kwasów tłuszczowych (ang. *free fatty acid receptor 3*)

FIGF – czynnik wzrostu indukowany c-fos (ang. *c-fos-induced growth factor*)

GRP41 – receptor 41 wiążący krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. *G protein coupled receptor 41*)

GRP43 - receptor 43 wiążący krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. *G protein coupled receptor 43*)

GSTO1 – omega 1 S-transferaza glutationowa (ang. *glutathione S-transferase omega-1*)

GTN – triazotan glicerolu, nitrogliceryna (ang. *glyceryl trinitrate, nitroglycerin*)

H2O2 – nadtlenek wodoru (ang. *hydrogen peroxide*)

Hb-NO – hemoglobina nitrozylowana (ang. *haem-nitrosylated haemoglobin*)

HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoprotein*)

HSP27 – białko szoku cieplnego 27 (ang. *heat shock protein 27*)

HSP40 – białko szoku cieplnego 40 (ang. *heat shock protein 40*)

HSP47 – białko szoku cieplnego o masie 47kDa (ang. *Heat shock protein 47kDa*)

HSP60 – białko szoku cieplnego o masie 60 kDa (ang. *60 kDa heat shock protein*)

HSP90 - białko szoku cieplnego 90 (ang. *heat shock protein 90*)

HSP90B1 – endoplazmina (ang. *endoplasmin*)

HSPA4 – białko szoku cieplnego o masie 70 kDa (ang. *heat shock 70 kDa protein 4*)

HTRA1 – proteaza serynowa HTRA1 (ang. *serine protease HTRA1*)

IF – filamenty pośrednie (ang. *intermediate filament*)

IGFBP-7 – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 7 (ang. *insulin-like growth factor-binding protein 7*)

Ip – punkt izoelektryczny (ang. *isoelectric point*)

IPG – immobilizowany gradient pH (ang. *immobilized pH gradient*)

KKT – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

LCAT - acetylotransferaza lecytyno-cholesterolowa (ang. *lecithin-cholesterol acetyltransferase*)

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (ang. *low density lipoprotein*)

LMNA – prelamina A/C (ang. *prelamin A/C*)

MALDI TOF – desorpcja/ionizacja laserowa z udziałem matrycy i analizatorem czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*)

MALDI TOF MS/MS – desorpcja/ionizacja laserowa z udziałem matrycy i analizatorem czasu przelotu sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation coupled with Time-of-Flight tandem mass spectrometer*)

MALDI TOF/TOF - desorpcja/ionizacja laserowa z udziałem matrycy i podwójnym analizatorem czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time of Flight*)

MMP - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinase*)

MW – masa molekularna (ang. *molecular weight*)

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NO – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*)

ONOO- - nadtlenoazotyn (ang. *peroxynitrate*)

ORM1 – alfa-1 kwaśna glikoproteina (ang. *alpha-1-acid glycoprotein*)

PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PDI – disulfidoizomeraza białkowa (ang. *protein disulfide isomerase*)

PF4 – czynnik płytkowy 4 (ang. *platelet factor 4*)

PMF – metoda „masowego odcisku palca” (ang. *peptide mass fingerprinting*)

PRDX1 – peroksyredoksyna 1 (ang. *peroxiredoxin 1*)

PTM – modyfikacja posttranslacyjna (ang. *post-translational modification*)

QTOF – kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (ang. *Quadrupole Time of Flight*)

RAA – renina-angiotensyna-aldosteron

RCN1 – retikulokalbina 1 (ang. *reticulocalbin 1*)
RCN2 – retikulokalbina 2 (ang. *reticulocalbin 2*)
ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
SCA-1 – antygen komórek macierzystych-1 (ang. *stem cell antigen 1*)
SDS – siarczan dodecyłu sodu (ang. *sodium dodecyl sulphate*)
SDS PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SEPT8 – septyna 8 (ang. *septin 8*)
SMCs – komórki mięśni gładkich (ang. *smooth muscle cells*)
SM-MHC – łańcuch ciężki miozyny mięśni gładkich (ang. *smooth muscle myosin heavy chain*)
TC – cholesterol całkowity (ang. *total cholesterol*)
TCP1 – podjednostka alfa białka kompleksu T1 (ang. *T-complex protein 1 subunit alpha*)
TF – transferyna (ang. *transferrin*)
TG – trójglicerydy (ang. *triglycerides*)
TIMP2 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 2 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 2*)
TSP-1 – trombospondyna 1 (ang. *thrombospondin 1*)
TUBA1B – łańcuch tubuliny alfa-1B (ang. *tubulin alpha-1B chain*)
TXNDC5 – białko zawierające domenę tioredoksyny 5 (ang. *thioredoxin domain-containing protein 5*)
VCL – winkulina (ang. *vinculin*)
VCP – przejściowa ATPaza retikulum endoplazmatycznego (ang. *transitional endoplasmic reticulum ATPase*)
VIM – wimentyna (ang. *vimentin*)
VSMCs – naczyniowe komórki mięśni gładkich (ang. *vascular smooth muscle cells*)
 α -SMA – alfa aktyna mięśni gładkich (ang. *alpha smooth muscle actin*)

Streszczenie

Wstęp: Dieta ma ogromny wpływ na czynność organizmu. Prawidłowo zestawione składniki pokarmowe wykazują korzystne oddziaływanie na procesy fizjologiczne. W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie, w kontekście ich działania prozdrowotnego wzbudzają suplementy. Ich przykładem są prebiotyki, w tym należąca do fruktanów inulina. Do tej pory badania nad wpływem fruktanów typu inulinowego skupiały się głównie na jej cechach prebiotycznych, modyfikujących mikrobiotę jelitową, organizmu gospodarza. W przypadku zwierząt hodowlanych prace skupiały się na poprawie efektów produkcyjnych (np. poprawa wykorzystania paszy, zwiększenie przyrostów masy ciała).

Zagadnienie to jednak nie zostało szerzej zbadane w odniesieniu do aorty. Brak jest doniesień związanych z pośrednim wpływem fruktanów typu inulinowego na fizjologię aorty. Markerami świadczącymi o zmianach czynnościowych aorty mogą świadczyć zmiany ekspresji białek, które zaangażowane są w różne procesy komórkowe, biologiczne czy metaboliczne. Analiza zmian ekspresji białek w aorcie pod wpływem inuliny umożliwia wyodrębnienie białek kluczowych dla istotnych procesów biologicznych i zrozumienie tych procesów w odpowiedzi na czynnik doświadczalny na poziomie molekularnym.

Cel: Celem niniejszej pracy było określenie wpływu suplementacji diety fruktanami typu inulinowego w postaci natywnej inuliny oraz suszu z korzenia cykorii na zmiany proteomu aorty u rosnących prosiąt oraz wygenerowanie/utworzenie powtarzalnych, reprezentatywnych map białkowych analizowanej tkanki.

Materiał i metody: Badania zostały przeprowadzone na materiale biologicznym (aorta wstępująca), pobranym od dwudziestu czterech prosiąt, 50 – dniowych mieszańców komercyjnych linii świń PIC x Penarlan P76 (samce). Zwierzęta zostały podzielone na 3 grupy żywieniowe (n=8), które otrzymywały: dietę kontrolną (grupa K), dietę eksperymentalną z 2% dodatkiem wodnego wyciągu inuliny (grupa D1), oraz dietę eksperymentalną z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii (grupa D2). Białka tkanki aorty rozstały rozdzielone z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej (2DE). Natomiast identyfikacji białek dokonano za pomocą spektrometrii mas typu MALDI-ToF. W celu określenia lokalizacji komórkowej oraz powiązania ich z procesami biologicznymi wykorzystano bazę danych UniProt oraz narzędzia bioinformatyczne Euk-mPlock 2.0 i STRING v10.

Wyniki: Dieta z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii spowodowała zmiany w ekspresji 32 białek, z których zidentyfikowano 19, reprezentujących 15 różnych produktów genowych. Natomiast dodatek do diety 2% wodnego roztworu inuliny wpłynął na zmiany w ekspresji 23 białek aorty. Spośród tych białek zidentyfikowano 13, które reprezentują 12 odrębnych produktów genowych. Wśród zidentyfikowanych białek, które wykazują zmiany w ekspresji pod wpływem diet doświadczalnych znalazły się: białka zaangażowane w komórkową odpowiedź na stres, białka cytoszkieletarne odpowiedzialne za funkcję i utrzymanie komórki, składanie, organizację i ruch, białka uczestniczące w mechanizmach regulujących ciśnienie krwi, wspomaganie napięcia naczyniowego i w rozwój śródbłonna naczyniowego, w tym kluczową rolę w sygnalizacji komórkowej. Ponadto, uzyskano powtarzalne profile białkowe aorty rosnących prosiąt oraz dokonano globalnej charakterystyki zidentyfikowanych białek.

Wnioski: Dodatek do diety wodnego wyciągu inuliny oraz suszu z korzenia cykorii spowodował zmiany proteomu aorty u rosnących prosiąt. Natomiast suplementacja diety fruktanami typu inulinowego nie spowodowała zmian w stężeniu cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w aorcie rosnących świń. Wygenerowane powtarzalne mapy białkowe 2D reprezentujące charakterystyczny wzór białek aorty dla *Sus scrofa*, mogą stanowić bardzo istotne odniesienie w badaniach skierowanych na charakterystykę zmian w profilach białkowych pod wpływem zmiennych warunków fizjologicznych czy wybranego czynnika doświadczalnego. Wyniki badań mogą też stanowić wsparcie diagnostyczne i prognostyczne w profilaktyce i/lub prewencji zootechniczno-weterynaryjnej.

Abstract

Introduction: Diet can significantly impact the function of an organism. Undoubtedly, a well-balanced diet may positively affect a multiple physiological mechanisms. In recent years there has been an increased interest in the role of dietary supplements in health maintaining and enhancing animal performance. These "nutrition boosters" also include prebiotics, especially inulin. Data so far available have focused mainly on their prebiotic properties in modulating the microbiota composition in the gastrointestinal tract. In case of farm animals research have focused on improving production results (e.g. improve feed efficiency, increase weight gain). However, this issue is not widely investigated in terms of aortic functions. There are no reports on indirect effects of inulin-type fructans on the physiology of aorta. Changes in protein expression patterns which are involved in various cellular, biological or metabolic processes may serve as a potential markers reflecting functional changes in the aorta. Analysis of changes in protein expression in the aorta will allow for further assessment of the dietary inulin impact on aorta function, as well as finding explanation for the observed protein interaction.

Aim: The aim of the study was to evaluate the effect of dietary inulin or dried chicory root supplementation on changes in protein expression profile of aorta in growing piglets and creation of representative protein maps of this tissue.

Material and methods: The study was carried out on biological material (ascending aorta), collected from twenty four 50-day-old piglets, PIC x Penarlan P76 crossbred males (castrated). Animals were divided into 3 groups (n=8), and fed with: control diet (K group), experimental diet consisting of 2% of water solution of chicory inulin-type fructans (D1 group) and experimental diet with 4% dried chicory root (D2 group). Aortic proteins were separated using two-dimensional electrophoresis (2DE). Protein identification was performed with the aid of MALDI-ToF mass spectrometry. The UniProt databases, Euk-mPlock 2.0 and STRING v10 bioinformatics tools were used to determine the cellular localization of proteins and to connect them to specific biological processes.

Results: Diet supplemented with 4% of chicory root triggered changes in expression of 32 protein spots in aorta, representing 15 different gene products. Of these 19 proteins were identified. A diet supplemented with 2% water extract of inulin induced expression changes of 23 protein spots, representing 12 different gene products. Of these 13 proteins were identified. Identified proteins were found to be involved in the cellular stress

response, cytoskeletal organization (maintenance, assembly and movement of cells), blood pressure regulating, supporting vascular tone and development of vascular endothelium. Moreover, reproducible protein profiles of aorta were obtained and global characteristics of the identified proteins was made.

Conclusions: Diet supplemented with water extract of inulin and dried chicory root triggered changes in aorta proteome of growing piglets. Moreover, dietary supplementation with inulin-type fructans did not affect total cholesterol and triglycerides values in the aorta of growing pigs. Obtained reproducible two-dimensional protein maps representing the characteristic pattern of the aorta for *Sus scrofa*, may be used to compare protein expression patterns in response to physiological conditions or/and experimental factors. Moreover, obtained results may be useful for diagnosis and prevention in zootechnics and veterinary science.

1. Wstęp

Wszystkie organizmy żywe posiadają zdolność do utrzymania równowagi środowiska wewnętrznego – homeostazy. Homeostaza organizmu zależy od czynności wielu narządów i układów w tym układu krążenia. Zapewnienie utrzymania odpowiedniego przepływu krwi, umożliwiającego optymalne zaopatrzenie tkanek w tlen, składniki odżywcze i substancje biologiczne czynne uwarunkowane jest stałą pracą układu krążenia. Układ krążenia to przede wszystkim serce i naczynia tworzące czynnościową całość niezbędną dla prawidłowego krążenia krwi. Prawidłowa czynność serca jak i naczyń wpływa na sprawność działania układu krążenia. Do najważniejszych czynności naczyń w tym aorty należy utrzymanie odpowiedniego napięcia ich ścian co umożliwia zapewnienie ciśnienia krwi umożliwiającego jej krążenie. Ze względu na dużą zawartość włókien sprężystych aorta posiada zdolność do zamiany fazowego charakteru przepływu krwi w ciągły jej przepływ do dalszych odcinków drzewa tętniczego/naczyniowego. Odzwierciedleniem zmian zachodzących w aorcie spowodowanych dietą, mogą być zmiany poziomu ekspresji określonych grup białek tej tkanki związanych z jej funkcją czynnościową. Analiza zmian ekspresji białek tkanki aorty pełniących określone role, umożliwi zrozumienie mechanizmów molekularnych w odpowiedzi na czynnik żywieniowy.

W ostatnim czasie uwaga badaczy skupia się na wprowadzaniu do diety suplementów o charakterze prebiotycznym. Jednym z takich dodatków są fruktany typu inulinowego, które występują jako materiał zapasowy w wielu roślinach. Ich właściwości prebiotyczne są dobrze udokumentowane w wielu pracach naukowych. Do tej pory badania nad wpływem fruktanów typu inulinowego skupiały się głównie na wpływie i modulacji mikrobiomu przewodu pokarmowego organizmu gospodarza. Wiadomo jednak, że suplementacja błonnika pokarmowego, która moduluje skład mikroflory jelitowej, może jednocześnie oddziaływać z fizjologią gospodarza i odgrywać ważną rolę w funkcjonowaniu i strukturze tkanek w tym układu sercowo-naczyniowego. Analiza piśmiennictwa wskazuje na niewielką ilość prac związanych z wpływem fruktanów typu inulinowego na profil białkowy aorty u rosnących zwierząt. Dlatego też uzasadnione wydaje się podjęcie badań nad wyjaśnieniem wpływu dodatku fruktanów typu inulinowego na zmiany ekspresji białek (proteomu) aorty u rosnących świń.

Szybki rozwój wysokosprawnych narzędzi „omicznych” (m.in. proteomiki) biologii molekularnej, zapewniają powiązanie między proteomem a fizjologią danego układu, umożliwiając profilowanie molekularne wybranych tkanek czy narządów. Istotnym znaczeniem w badaniach proteomicznych poszczególnych tkanek są w pierwszej kolejności analizy związane z utworzeniem kompletnej i powtarzalnej mapy reprezentującej charakterystyczny wzór białek. Referencyjne mapy białkowe stanowią istotne odniesienie w badaniach skierowanych na charakterystykę zmian w profilach białkowych pod wpływem zmiennych warunków fizjologicznych czy wybranego czynnika doświadczalnego. Narzędzia proteomiczne znajdują również zastosowanie w badaniach związanych ze zdrowiem i dobrostanem zwierząt gospodarskich, jak również jakością produktów pochodzenia zwierzęcego. Zastosowanie proteomiki w badaniach różnych tkanek i narządów świni ma szersze zastosowanie niż przypadku pozostałych zwierząt hodowlanych. Anatomiczne i fizjologiczne podobieństwa tego gatunku do organizmu człowieka sprawia, że świnia jest doskonałym organizmem modelowym w badaniach biomedycznych.

W prezentowanej pracy zastosowano elektroforezę dwukierunkową, która umożliwia jednoczesny rozdział mieszaniny białek i określenie zmian w ekspresji pojedynczych spotów białkowych. Ponadto wykorzystanie spektrometrii mas typu MALDI-ToF pozwoliło na identyfikację białek analizowanych profili białkowych. Zastosowanie narzędzi proteomicznych umożliwia wyjaśnienie i pełniejsze zrozumienie zmian (na poziomie proteomu) zachodzących w aparacie molekularnym w odpowiedzi na suplementację fruktanami typu inulinowego w diecie rosnących prosiąt.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1 Budowa i funkcje układu tętniczego

Każdy żywy organizm do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje tlenu i składników odżywczych oraz eliminowania produktów przemiany materii w celu utrzymania homeostazy organizmu. Układ krążenia jest to zamknięty system naczyń krwionośnych, w którym siłą napędową stanowi serce. Odpowiedzialny jest za rozprowadzanie krwi do wszystkich tkanek i komórek organizmu. Wraz z krwią dostarczany jest tlen, składniki odżywcze, elektrolity, hormony do komórek poszczególnych tkanek oraz odbieranie z nich dwutlenku węgla i zbędnych produktów przemiany materii, które transportowane są do narządów wydalniczych. Ponadto układ krążenia odpowiedzialny jest również za rozprowadzanie energii i utrzymanie odpowiedniej temperatury w całym organizmie (Górniacka, 2013; Jarvis, 2018).

W anatomii naczyń wyróżnia się trzy rodzaje układów naczyniowych: układ tętniczy, „rozgałęziający się” (tętnice, tętniczki), układ żylny, „zbiegający się” (żyły i żyłki) oraz sieć naczyń włosowatych (Marieb i Hoehn, 2015). Wszystkie naczynia krwionośne z wyjątkiem kapilar zbudowane są z trzech warstw:

Błona wewnętrzna (*tunica interna*): składa się ze śródbłonna, który wyściela wewnętrzną warstwę naczynia. Jego rolą jest zapewnienie odpowiedniej homeostazy naczynia krwionośnego poprzez wydzielanie czynników zapobiegających nadmiernej krzepliwości, dzięki którym utrzymuje prawidłowy przepływ płynów. Ponadto stanowi również barierę pomiędzy biochemicznymi i biomechanicznymi oddziaływaniami jakie występują między składnikami morfotycznymi krwi a ścianą naczynia. Funkcjonalna integralność komórek śródbłonna jest istotnym czynnikiem homeostazy naczyniowej (Trojan i wsp., 2014; Jarvis i Saman, 2018; Sheng i Zhu, 2018).

Błona środkowa (*tunica media*), zbudowana głównie z okrężnie ułożonych warstw komórek mięśni gładkich, pomiędzy którymi występują różne ilości włókien sprężystych oraz kolagenowych, w zależności od rodzaju naczynia. Warstwa ta jest odpowiedzialna za regulację wewnętrznej średnicy naczynia (Trucker i wsp., 2020)

Błona zewnętrzna, przydanka (*tunica externa*): zawiera głównie włókna kolagenowe i sprężyste. Zapewnia strukturalne podparcie i kształt naczynia (Kaga i wsp., 2013).

W każdej warstwie ilość włókien mięśniowych i kolagenowych jest różna w zależności od wielkości i umiejscowienia naczynia.

Tętnice pełnią ważną rolę w transporcie krwi pod wysokim ciśnieniem z serca do tkanek i narządów w całym organizmie. Aby wytrzymać opór wysokiego ciśnienia krwi w ścianach tętnic znajduje się duża ilość włókien elastynowych. Obecność elastyny w dużych naczyniach krwionośnych umożliwia regulację rozmiaru i średnicy naczynia w zależności od panującego ciśnienia krwi. Szacuje się, że około 10% do 15% całkowitej objętości krwi znajduje się w układzie tętniczym (Trucker i wsp., 2020). W układzie tętniczym wyróżnia się:

- a) tętnice typu sprężystego (duże): do tego rodzaju naczyń zalicza się m.in. aortę i główne jej odgałęzienia oraz pień płucny. Warstwa środkowa ściany jest silnie rozbudowana, w której warstwa blaszek sprężystych i komórek mięśni gładkich ułożone są w sposób naprzemienny i koncentryczny. Ze względu na wysoką elastyczność ściany, naczynia tego typu odgrywają dużą rolę w amortyzowaniu różnicy ciśnienia krwi podczas skurczu komór oraz zamianie przepływu krwi o charakterze fazowym w ciągły. Właściwości sprężyste tego rodzaju tętnic pozwalają na utrzymanie względnie stałego gradientu ciśnień pomimo stałego pompowania krwi przez serce (Trucker i wsp., 2020).
- b) tętnice typu mięśniowego (średnie): do tego rodzaju zalicza się np. tętnice wieńcowe, tętnice krezkowe. W warstwie środkowej komórki mięśni gładkich są ściśle ułożone, a od warstwy wewnętrznej i przydanki jest wyraźnie oddzielona za pomocą warstwy włókien sprężystych. Tętnice tego typu pełnią funkcję dystrybucyjną, ponieważ regulują one ilość krwi, która jest doprowadzana do narządów poprzez zmiany naprężenia mięśniówki w warstwie środkowej. Zmniejszenie średnicy naczynia poprzez skurcz mięśniówki powoduje spowolnienie przepływu krwi, natomiast poszerzenie światła naczynia podczas rozluźnienia mięśniówki skutkuje jego zwiększeniem (Trucker i wsp., 2020).
- c) arteriole (małe): najmniejsze naczynia w układzie tętniczym, charakteryzują się silną warstwą mięśniową, które stawiają znaczny opór dla przepływu krwi przez naczynia włosowate. Odpowiadają na zapotrzebowanie tkanki na więcej składników odżywczych/tlenu. Arteriole odgrywają istotną rolę w układowym oporze naczyniowym ze względu na małą zawartość włókien elastynowych w ścianie naczynia (Trucker i wsp., 2020).

2.1.1. Budowa i rola aorty

Aorta (tętnica główna) jest największym a zarazem najważniejszym naczyniem krwionośnym w krążeniu systemowym, którego rolą jest zmiana fazowego charakteru przepływu krwi w ciągły jej przepływ do zbiornika tętniczego (funkcja amortyzująca). Budowa ściany aorty dostosowana jest do czynności jakie spełnia w układzie naczyniowym i tak samo jak pozostałe tętnice, ściana składa się z trzech nałożonych na siebie warstw (*tunica interna*, *tunica media* i *tunica adventitia*), ale najbardziej znaczącą jest warstwa środkowa (Sartore i wsp., 2001). Składa się głównie z komórek mięśni gładkich (SMC, *ang.* smooth muscle cells) otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, *ang.* extracellular matrix) złożoną z kolagenu typu I, III, IV, lamininy i elastyny (Ichii i wsp., 2001). Te składniki ECM odgrywają ważne funkcje w naczyniach krwionośnych, w których kolagen typu I i III są odpowiedzialne za wytrzymałość na rozciąganie, a wraz z elastyną przyczyniają się do właściwości elastycznych/sprężystych aorty (Dobrin i wsp., 1984; Dobrin i Mrkvicka, 1994). Natomiast laminina i kolagen typu IV są głównymi składnikami błon podstawnych śródbłonna i SMC (Shekhonin i wsp., 1985; Timpl, 1996). Laminina i elastyna wiążą się z komórkami za pośrednictwem receptora elastyny i lamininy (E/LR), receptora odmiennego od integrzyn (Spofford i Chilian, 2001), który znajduje się zarówno na komórkach śródbłonna, jak i naczyniowych komórkach mięśni gładkich (VSMC, *ang.* vascular smooth muscle cells) przez co może indukować różne szlaki przekazywania sygnałów (Hinek, 1996; Labat-Robert i Robert, 2000), a tym samym kontrolować napięcie naczyniowe (Faury i wsp., 1998).

Tętnica główna składa się z trzech głównych segmentów: **części wstępnej**, która zaczyna się w przedłużeniu stożka tętniczego lewej komory, tworząc tzw. opuszkę aorty składającej się z trzech zatok. Na wysokości opuszki aorty odchodzą tętnice wieńcowe, które zaopatrują mięsień sercowy w tlen i składniki odżywcze (Freeman i wsp., 2013). Kolejnym odcinkiem jest **łuk aorty**, od którego odchodzą trzy główne gałęzie: pień ramiennie-główny, tętnica szyjna wspólna lewa oraz tętnica podobojczykowa lewa (Trucker i wsp., 2020). Łuk aorty spełnia ważną rolę w utrzymaniu homeostazy ciśnienia tętniczego w organizmie. Baroreceptory zlokalizowane w przydanie łuku tworzą jeden z elementów układu sprzężenia zwrotnego pomiędzy układem nerwowym a sercowo-naczyniowym. Receptory te wrażliwe są na rozciąganie ściany aorty pod wpływem naporu krwi. Wzrost ciśnienia powoduje pobudzenie układu

przywspółczulnego powodując zmniejszenie częstości rytmu serca. Natomiast spadek ciśnienia powoduje aktywację układu współczulnego, który skutkuje zwiększeniem rzutu serca (Sopolińska i wsp., 2012; Bałczewska i wsp., 2015). Jest to jeden z głównych mechanizmów, który pomaga zapobiegać szybkim, drastycznym zmianom ciśnienia krwi. W ścianie łuku aorty znajdują się również chemoreceptory, które wrażliwe są na zmiany zawartości tlenu i dwutlenku węgla we krwi. Działają podobnie jak baroreceptory, gdzie obniżony poziom O_2 powoduje pobudzenie układu współczulnego, a także ośrodka oddechowego (wzrost ilości oddechów) (Lau i wsp., 2016). Ostatnim segmentem aorty jest **część zstępująca** składająca się z odcinka piersiowego oraz brzusznego. Od odcinka piersiowego odchodzą m. in. tętnice oskrzelowe, śródpiersia, przełyku, osierdzia oraz międzyżebrowe (Gupta i wsp., 2017), natomiast aorta brzuszna zaczyna się na wysokości przepony i tworzy duży pień trzewny, od którego odchodzą m. in. tętnice nerkowe, krezkowe oraz biodrowe. Następnie część brzuszna przedłuża się w tętnicę krzyżową pośrodkową (u człowieka) lub tętnicę ogonową (u zwierząt ogoniastych) aż do końcowego odcinka kręgosłupa (Lech i Swaminathan, 2017).

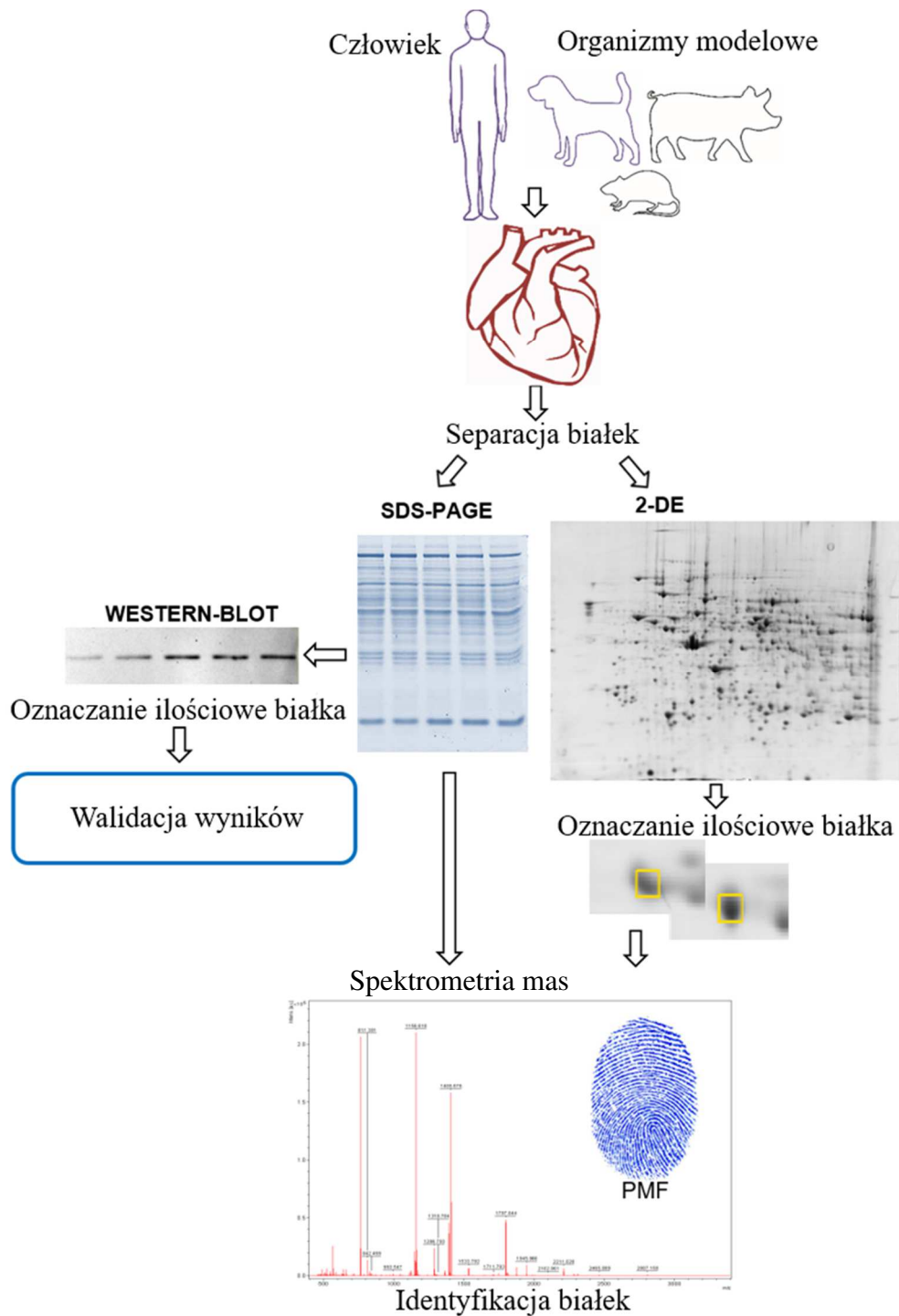
Podsumowując, naczynia krwionośne współpracują w zamkniętym obiegu z sercem, dostarczając organizmowi tlen i składniki odżywcze oraz eliminując produkty przemiany materii. Różne cechy anatomiczne i fizjologiczne tętnic, tętniczek, żył, żyłek i naczyń włosowatych pozwalają każdemu z nich prawidłowo wykonywać swoje funkcje. Ciśnienie tętnicze i perfuzja życiowa narządów są utrzymywane przez szereg mechanizmów implikujących baroreceptory, chemoreceptory, układ RAA i oś podwzgórze-przysadka. Zrozumienie tych mechanizmów fizjologicznych pomaga zrozumieć jakim zmianom adaptacyjnym ulegają poszczególne odcinki układu naczyniowego pod wpływem różnych czynników zewnętrznych (np. dieta) jak i wewnętrznych.

2.2. Proteomika

Przez ostatnie dwie dekady bardzo dużo uwagi poświęcono na poznaniu przede wszystkim genomu człowieka, a także innych gatunków zwierząt (w tym gospodarskich). Analizy te nie dawały jednak pełnej odpowiedzi na pytania dotyczące funkcjonowania organizmu, ponieważ wiele informacji trudno jest uzyskać na poziomie genomu lub transkryptomu komórki. Jest to spowodowane tym, że jeden gen może kodować wiele białek, które są wynikiem modyfikacji potranskrypcyjnych, potranslacyjnych czy

alternatywnego splicingu. (Wilkins i wsp., 1996; Bendixen 2005). Dlatego też zaczęto poszukiwać innych technik, które pomogą wypełnić lukę między sekwencją genomu a zachowaniem komórkowym w celu lepszego zrozumienia funkcjonowania organizmu. W tym celu podjęto badania w kierunku określenia białkowych produktów genomu – PROTEOMU (PROTein complement to genOME), które pojawiają się w organizmie przez całe jego życie (Marianowski i wsp., 2013). Proteom określan jest jako mieszanina białek znajdujących się w komórce, tkance czy organizmie w danym czasie, który charakteryzuje się dynamiczną strukturą pomimo tego, że jest on determinowany w dużym stopniu przez statyczny genom (Tarkowski i Girstrun, 2005; Lopez, 2007). Dziedziną nauki, która zajmuje się analizą i funkcją białek oraz ich wzajemnych relacji jest proteomika (Marianowski i wsp. 2013). Dzięki narzędziom molekularnym, które wykorzystywane są w badaniach proteomicznych możliwa jest analiza setek lub tysięcy białek, które występują w badanym organizmie w danym czasie (Ożgo i wsp., 2007; Lopez, 2007; Marianowski i wsp., 2013). Najczęściej stosowaną techniką jest elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakrylamidowym (2D PAGE), która pozwala na jednoczesny rozdział mieszaniny białek, w zależności od wartości punku izoelektrycznego i masy molekularnej, jak również umożliwia detekcję białek przy zachowaniu wysokiej rozdzielczości (Herosimczyk i wsp., 2006). Ponadto wykorzystanie spektrometrii mas typu MALDI-TOF (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization, time of flight*) umożliwia identyfikację białek, która oparta jest na jonizacji i desorpcji laserowej wspomaganej matrycą badanych prób oraz dokładnym pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego. Metoda ta wykorzystywana jest ponadto do analizy modyfikacji potranslacyjnych białek, określania współzależności między białkami, jak również do opisywania kierunku zmian ich ekspresji pod wpływem szerokiego spektrum czynników (Ożgo i wsp., 2007; Yates i wsp., 2009; Hale, 2013). Dużą zaletą laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej matrycą jest wysoka czułość, która w połączeniu z elektroforezą dwukierunkową w żelu poliakrylamidowym umożliwia analizę złożonych mieszanin biologicznych np. peptydów i białek (Pomastowski i Buszewski, 2014). W celu poszukiwania zmian oraz/lub walidacji otrzymanych wyników badań wykorzystuje się elektroforezę SDS - PAGE z techniką western-blot. Najczęściej wykorzystywane strategie analityczne wykorzystywane w badaniach proteomicznych przedstawiono na rysunku 1.

Rysunek 1. Najczęściej stosowane strategie analityczne wykorzystywane w badaniach proteomicznych (Marynowska i wsp., 2017).



2.2.1. Strategie proteomiczne w badaniu czynności układu sercowo – naczyniowego

Białka są głównymi nośnikami aktywności biologicznej, dlatego poznanie jakim ulegają zmianom pod wpływem szerokiego spektrum czynników, może wnieść wiele informacji o molekularnych mechanizmach jakie zachodzą w komórkach, tkankach czy organach (Tarkowski i Girstrun, 2005). Techniki stosowane w analizach proteomicznych mają ogromny potencjał poznawczy w celu lepszego zrozumienia czynności układu sercowo – naczyniowego. Proteomika jest jedną z dziedzin, która pozwala na analizę, identyfikację i określenie funkcji szerokiej gamy komponentów białkowych, które bezpośrednio lub pośrednio mają wpływ na funkcjonowanie serca i naczyń krwionośnych. Ponadto proteomika umożliwia pozyskanie nowych informacji, których nie dostarczają konwencjonalne/tradycyjne metody stosowane w badaniu funkcji czy patofizjologii układu sercowo – naczyniowego.

Przez ostatnie kilkanaście lat zostało przeprowadzonych wiele badań wykorzystujących narzędzia proteomiczne do oceny materiałów biologicznych mięśnia sercowego u człowieka i wielu gatunków zwierząt (Corbett i wsp., 1994; Li i wsp., 1999; Weekes i wsp., 1999; Herosimczyk i wsp., 2015). Niemniej jednak narzędzia proteomiczne stosowane w badaniach mięśnia sercowego wykorzystywane są głównie w celu poznania mechanizmów patofizjologicznych. Do tej pory opublikowano prace dotyczące zmian w ekspresji białek w takich stanach jak: kardiomiopatia rozstrzeniowa, przerost mięśnia sercowego, itp. (Farmakis i wsp., 2018). Analizy profilu białkowego serca u człowieka przeprowadzili Jungblunt i wsp. (1994). Autorzy wykorzystując elektroforezę dwukierunkową (2DE) uzyskali 3229 spotów białkowych na żelach poliakrylamidowych, spośród których zidentyfikowali 33 białka wykorzystując metodę mikrosekwencjonowania, natomiast 20 białek poprzez porównanie ich sekwencji w białkowej bazie danych (Martinsried Institute Protein Sequence Database). Pleissner i wsp. (1995) przeprowadzili badania profili białkowych fragmentów lewej komory serca oraz prawego przedsionka pobranych od pacjentów, u których stwierdzono kardiomiopatię rozstrzeniową. Autorzy wykazali różnice w ekspresji białek między tymi regionami. Z zastosowaniem elektroforezy 2D otrzymali 197 spotów białkowych w tym 40 spotów wykazywało różnice między komorą a przedsionkiem. Ponadto autorzy podają, że 3 spoty białkowe (izoformy łańcucha lekkiego miozyny 1 i 2) były charakterystyczne tylko dla przedsionka i nie były obecne w próbach pobranych z lewej komory. Natomiast 2 spoty białkowe występowały tylko w przypadku lewej komory

(mutaza fosfoglicerynianowa, łańcuch alfa syntazy ATP). Podobne wyniki otrzymali Li i wsp. (2012) w swoich badaniach, w których zaobserwowali zmianę ekspresji 25 białek, biorących udział w wiązaniu białek, jonów oraz białek odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej struktury cytoszkieletu. Natomiast De Agüero i wsp. (2017) w swoich badaniach wykorzystując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej zaobserwowali 26 białek, których zmiana ekspresji była spowodowana zmianami patologicznymi. Autorzy podają, że 14 białek macierzy zewnątrzkomórkowej wykazywało obniżoną ekspresję, 4 białka aparatu kurczliwego charakteryzowało się zwiększoną ekspresją. Ponadto De Agüero i wsp. (2017) zidentyfikowali 6 białek cytoszkieletarnych (wzrost ekspresji 4 białek, obniżenie 2 białek). Knecht i wsp. (1994) również dokonali analizy tkanki serca osób chorych na kardiomiopatię. Materiał został pobrany z lewej komory od 5 pacjentów, u których stwierdzono kardiomiopatię (grupa doświadczalna) oraz od 5 pacjentów, u których podejrzewano to schorzenie (grupa kontrolna). Autorzy w swoich analizach wykorzystali elektroforezę dwukierunkową, w wyniku której otrzymali 374 spoty białkowe, a spośród nich zaobserwowali, że 7 białek wykazywało zwiększoną ekspresję, natomiast 6 charakteryzowało się obniżoną ekspresją w grupie doświadczalnej w porównaniu z kontrolną.

Zastosowanie narzędzi proteomicznych ma ogromne znaczenie w poznaniu i lepszym zrozumieniu czynności naczyń krwionośnych. Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC) odgrywają kluczową rolę w schorzeniach układu krwionośnego. Zmiana ekspresji białek lub ich produktów (sekretom) może posłużyć jako swego rodzaju marker w przypadku powstawania lub trwania zmian patofizjologicznych układu naczyniowego. Tętnicze komórki mięśni gładkich (ASMC, ang. *arterial smooth muscle cell*) stanowią dobry model do badań proteomicznych w poszukiwaniu mechanizmów, które kontrolują zmiany tych komórek w czasie stanu chorobowego, poprzez ocenę ich zmiennej aktywności biologicznej w stosunku do rozwoju uszkodzenia naczynia. Dlatego też głównym celem autorów (Dupont i wsp., 2005) było utworzenie referencyjnych map białkowych komórek mięśni gładkich pobranych z tętnicy piersiowej od pacjentów, u których przeprowadzono zabieg wstawienia by-pasów. Autorzy pobrany materiał podzielili na dwie grupy tak, aby otrzymać proteom (białka wewnątrzkomórkowe) oraz sekretom (białka wydzielone do medium hodowlanego po 24 godzinnej inkubacji). Autorzy szczególną uwagę poświęcili białkom wydzielonym do medium, ponieważ w odpowiedzi na różne sygnały fizjologiczne jak i patologiczne, komórki te (ASMC) wytwarzają szeroką gamę

produktów biologicznych. Dupont i wsp. (2005) za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej dokonali rozdziału białek obu grup doświadczalnych, w wyniku którego otrzymali 1760 spotów białkowych dla pierwszej grupy i 1100 białek dla drugiej grupy. Spośród wszystkich spotów białkowych pierwszej grupy doświadczalnej wybrano 121 spotów białkowych, natomiast z drugiej grupy wybrano 40 spotów, które następnie autorzy poddali identyfikacji za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI – TOF. Dla pierwszej grupy autorzy zidentyfikowali 83 białka, a dla drugiej 18. Zidentyfikowane białka zostały sklasyfikowane w odniesieniu do ich funkcji fizjologicznych, z wykorzystaniem baz danych (Swissprot i Pubmed). Największą grupę białek, stanowiły białka wchodzące w skład cytoszkieletu (m.in. wimentyna, gelsolina, łańcuch β tropomiozyny, caldesmon, kalponina H2). Białka te regulują polimeryzację aktyny, co jest ważne w prawidłowym utrzymaniu kształtu naczyń krwionośnych, a także ich właściwości kurczliwych. Ponadto kalponina H2 jest białkiem, które odgrywa ważną rolę w regulacji oddziaływań między aktyną a miozyną, gelsolina ponadto zaangażowana jest również w proces indukcji apoptozy w przypadku występowania zmian miażdżycowych. Dupont i wsp. (2005) zidentyfikowali również białka regulatorowe, należące głównie do rodziny białek szoku cieplnego. Jednym z tych białek jest HSP 27, które odgrywa kluczową rolę w przebudowie filamentów aktynowych, co jest ważne w procesie migracji i kurczenia się komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej m.in. białko 2 wiążące kolagen (SERPINH1, bierze udział w procesie wewnątrzkomórkowego przetwarzania i wydzielania prokolagenu), metaloproteinaza 1 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMT-1, posiada zdolności do degradacji jednego z głównych składników macierzy zewnątrzkomórkowej – kolagenu, który odpowiedzialny jest za utrzymanie mechanicznej integralności ścian naczyń krwionośnych), autorzy sugerują, że nadekspresja MMT-1 może prowadzić do zbyt dużej aktywności kolagenolitycznej. Dupont i wsp. (2005) zidentyfikowali również białka, które biorą udział w obronie organizmu przed stresem oksydacyjnym. Wśród nich znalazły się glutationowa S-transferaza omega 1 (GSTO1) oraz peroksyredoksyna 1 (PRDX1). Enzymy te odpowiadają za utrzymanie odpowiedniego statusu redukcyjno – oksydacyjnego w komórce. Podwyższone poziomy tych białek spotyka się w przypadku występowania w naczyniach zmian spowodowanych powstawaniem m.in. blaszek miażdżycowych.

Inni autorzy Donners i wsp. (2005) przeprowadzili analizę proteomiczną materiału pobranego od pacjentów z tętnicy piersiowej. W celu rozdzielenia prób autorzy

wykorzystali technikę elektroforezy dwukierunkowej (2DE), w wyniku której otrzymali 800 spotów białkowych na żelu poliakrylamidowym, które mieściły się w zakresie pH od 4 do 7 i masie molekularnej od 900 do 3000 Da. Otrzymane spoty Donners i wsp. (2004) poddali dalszej analizie wykorzystując spektrometrię masową typu MALDI TOF/TOF w celu identyfikacji białek. Autorzy zidentyfikowali między innymi białka takie jak: β -winksyna (SORBS3, białko strukturalne wiążące winkulinę oraz odpowiedzialne za wiązanie włókien aktyny do podstruktur komórki, prawdopodobnie wzrost ekspresji tego białka może powodować zwiększoną adhezję płytek do ściany naczynia), α -1-antytrypsyna (AAT, białko ostrej fazy, które wydzielane jest przez wątrobę w przypadku występowania stanu zapalnego w organizmie. Autorzy podają, że w przypadku podwyższonej ekspresji tego białka możliwe jest zwiększenie procesu włóknienia naczynia krwionośnego, ponieważ AAT działa jako inhibitor kolagenazy), lipokalina 2 (LCN2, bierze udział w ostrych i przewlekłych procesach zapalnych, a także prawdopodobnie w przebudowie naczyń krwionośnych w przebiegu miażdżycy) (Radosz i Obuchowicz, 2013). Natomiast Molacek i wsp. (2013) przeprowadzili rozdział białek fragmentu aorty brzusznej pobranej od grupy pacjentów. Wykorzystując elektroforezę dwukierunkową (2DE) otrzymali 417 spotów białkowych, które następnie poddali identyfikacji za pomocą spektrometru masowego. Autorzy zidentyfikowali 25 białek, m.in. α -1-antytrypsyna (AAT), aneksynę A2 i A5 (ANXA2, ANXA5), białko szoku cieplnego o masie 70 kDa (HSP71), wimentyna (VIM), transgelina (TAGL), α -aktyna sercowa (ACTC), transferyna (TRFE), dehydrogenaza 1B alkoholowa (ADH1B). Autorzy podają, że zmiany ekspresji tych białek są charakterystyczne dla tętniaków aorty brzusznej.

Matsumoto i wsp. (2012) dokonali rozdziału białek fragmentów aorty brzusznej oraz tętnicy piersiowej pobranych od 12 osobowej grupy pacjentów. W swoim doświadczeniu użyli techniki nanochromatografii cieczowej oraz spektrometrię masową typu MALDI TOF/TOF. Autorzy otrzymali 505 białek pochodzących z aorty brzusznej oraz 507 dla tętnicy piersiowej. Podają również, że w wyniku przeprowadzonych analiz porównawczych 341 białek występowało w obu grupach badawczych. Natomiast 144 białka występowały tylko w próbach aorty brzusznej, a 146 było charakterystycznych dla tętnicy piersiowej. Wśród zidentyfikowanych białek wspólnych dla obu grup autorzy odnotowali występowanie białek zaangażowanych w metabolizm lipidów apolipoproteina AI (ApoA-I), apolipoproteina CIII (ApoC-III), apolipoproteina E (ApoE) (zaburzona przemiana tych białek przyczynia się do rozwoju miażdżycy), białka

odpowiedzialne za elastyczność ścian naczyń krwionośnych: kolagen α -1 typ I, III i XIV (COL1A1, COL1A3, COL1A4) (odpowiednia zawartość jest niezbędna dla integralności tętnic, aby znosiły siły wywierane przez ciśnienie krwi), fibulina 5 (FBLN5), białko macierzy zewnątrzkomórkowej, biorące udział w procesie elastogenezy). Matsumoto i wsp. (2012) zidentyfikowali również białka: glikoproteina α -2-HS (AHSG), osteoprotegeryna (OPG), osteopontyna (OPN) oraz enzymy związane ze stresem oksydacyjnym – dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz glutationową S-transferazę (GST).

Natomiast Stastny i wsp. (1986) dokonali separacji białek aorty człowieka, za pomocą elektroforezy (2DE) otrzymując 150 spotów białkowych, spośród których zidentyfikowali m.in. α 1-antytrypsynę (AAT), fetuinę A (AHSG), transferynę (TRFE) oraz apolipoproteinę A2 (ApoA-II). Autorzy sugerują, że szczególne znaczenie może mieć zmiana ekspresji AAT oraz AHSG w składzie białek wewnętrznej błony aorty, szczególnie w przypadku zmian spowodowanych miażdżycą. Podobne doświadczenie przeprowadzili Sung i wsp. (2006) na grupie pacjentów, od których pobrano fragment aorty. W swoich badaniach autorzy za pomocą spektrometrii mas zidentyfikowali 27 białek zaangażowanych w liczne procesy biologiczne, m.in.: aktywację metaloproteinazy macierzy, procesy migracji komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

Trochę inne podejście w analizie białek aorty człowieka zastosowali Martin-Rojas i wsp. (2012). Autorzy w swoich badaniach jako materiał badawczy wykorzystali zastawki aortalne pobrane od zmarłych pacjentów. Wykorzystując technikę elektroforezy 2D otrzymali 2156 spotów na żelu poliakrylamidowym, natomiast za pomocą spektrometru masowego typu MALDI TOF/TOF zidentyfikowali białka transportowe, które są zaangażowane w ochronę tkanek zastawek aortalnych przed uszkodzeniem, które może być spowodowane np. podniesionym poziomem frakcji LDL cholesterolu, lipoprotein, triglicerydów (transtyretyna, apolipoproteina A1, białko wiążące kwasy tłuszczowe). Autorzy zidentyfikowali również białka strukturalne lumikan, wimentynę (zmiana ekspresji tych białek może być wynikiem tego, że komórki poddawane są remodelingowi pośrednik włókien cytoszkieletu i macierzy pozakomórkowej), transgelineę. Wśród zidentyfikowanych białek znalazły się również białka takie jak: α -1-antytrypsyna, składnik amyloidu P, które zaangażowane są w procesy stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej szczególnie w przypadku zmian związanych z dysfunkcją tego narządu. Ponadto stwierdzili obecność białek zaangażowanych procesy redoks (dysmutaza ponadtlenkowa, glutationowa peroksydaza 3, glutationowa S-transferaza).

Narzędzia proteomiczne umożliwiają również analizę, identyfikację i określenie szerokiej gamy białek wchodzących w skład naczyń krwionośnych. Ważną rolę w funkcjonowaniu naczyń krwionośnych odgrywają naczyniowe komórki mięśni gładkich (VSMC), które odpowiadają za ich plastyczność. Cecha ta jest podstawą do migracji i proliferacji tych komórek w przypadku uszkodzenia naczynia krwionośnego (Verma i wsp., 2011). Owens i wsp. (2004) przeprowadzili badania na 3-miesięcznych świnich, od których pobrano fragmenty tkanek pochodzących z ujścia tętnicy wieńcowej, w celu wyizolowania VSMC. Badania miały na celu wykazać różnice między komórkami w stanie spoczynku oraz zaktywowane poprzez 48-godziną inkubację komórek w osoczu. Wykorzystując elektroforezę dwukierunkową autorzy stwierdzili, że najwięcej białek było zaangażowanych w regulację procesów redukcyjno-utleniających, metabolizm glukozy, a także białka odpowiedzialne za organizację cytoszkieletu. Największą jednak zmianę ekspresji zaobserwowali w przypadku białka szoku cieplnego o masie 60 kDa (HSP60) i białkowej izomerazy dwusiarczkowej (PDI). Autorzy sugerują, że modyfikacja potranslacyjna HSP 60 pobudza czynniki wzrostu, co może być kluczowym czynnikiem w migracji oraz proliferacji VSMC. Natomiast w przypadku PDI wzrost ekspresji tego białka może stanowić bodziec do rozrostu tkanki. Zidentyfikowane białka stanowią cele do dalszych badań we wczesnym etapie remodelingu VSMC, a także do projektowania nowych strategii terapeutycznych w profilaktyce i leczeniu chorób układu naczyniowego.

Techniki proteomiczne dają możliwość również analizy składu białkowego, materiału pobranego z aorty. Mayr i wsp. (2005), dokonali rozdziału białek aorty pobranych od 10 tygodniowych mysz. Autorzy wykorzystali w swoich badaniach elektroforezę dwukierunkową, za pomocą której otrzymali 1500 spotów białkowych na żelu poliakrylamidowym. Następnie białka poddali identyfikacji za pomocą spektrometrii masowej, w wyniku której zidentyfikowali białka zaangażowane w procesy antyoksydacyjne (peroksyredoksyna-1, wiąże nadtlenek wodoru, który przyczynia się do zwiększonego ryzyka pęknięcia ściany naczyń), a także białka biorące udział w metabolizmie energii (ApoE, która bierze udział w metabolizmie NADPH, co może sugerować, że komórki naczyń krwionośnych mogą być odpowiedzialne za metabolizm lipidów zamiast glukozy w przypadki hiperlipidemii), albuminę i fibrynogen. Również Yu i wsp. (2012) dokonali analizy białek aorty myszy, wykorzystując w swoich badaniach chromatografię cieczową oraz spektrometrię masową otrzymali 557 białek. Autorzy podają, że białka te należą do białek regulatorowych (Hsp 40, Hsp 90),

strukturalnych, które odpowiadają za organizację aktyny w cytoszkielecie (izoforma 1 filaminy A, białko 1 bogate w cysteinę i glicynę 1, łańcuch β -tropomiozyny, biorących udział w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych (miozyna IXa) oraz w metabolizmie i transporcie lipidów (białko wiążące oksysterol, siarczan sterylowy). Husi i wsp. (2014) wykorzystując technikę spektrometrii masowej podają, że w swoich badaniach otrzymali około 600 białek, które zaangażowane są w procesy miogenezy (miomezyna-2), waskularyzacji (transgelina, łańcuch lekki regulujący miozynę 2), metabolizmie kwasów tłuszczowych (syntaza kwasu tłuszczowego, karboksyloesteraza wątroby N), syntezie lipidów (syntaza cytrynianu ATP) oraz w procesach glikolizy (karboksylaza pirogronianowa, transketolaza).

Lin i wsp. (2010) dokonali rozdziału oraz identyfikacji białek aorty pobranej od grupy szczurów rasy Spargue-Dawley, wykorzystując elektroforezę dwukierunkową na żelu poliakrylamidowym, a także spektrometrię masową typu QTOF. Autorzy zidentyfikowali 82 białka spośród 540 spotów białkowych, które zaangażowane są w utrzymywanie prawidłowej struktury cytoszkieletu, a także funkcjonowanie aparatu kurczliwego (aktyna F i G, transferaza glutationowa, tropomiozyna 3 i 4, Hsp 70, Hsp 90, transgelina). Białka biorące udział w procesach antyoksydacyjnych m.in. peroksydaza glutationowa (usuwa nadtlenuk wodoru, a także bierze udział w detoksykacji wodoronadtlenków lipidów, prawdopodobnie jej niedobór sprzyja szybszemu powstawaniu blaszki miażdżycowej), dehydrogenaza aldehydowa, transferaza S glutationu (katalizuje redukcję nadtlenków substancji aterogennych tworząc tioestry), dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (aktywność tego enzymu jest korzystna dla aorty z uwagi na zmniejszenie produkcji nadtlenków, a tym samym może zmniejszać prawdopodobieństwo do powstawania zmian miażdżycowych). Wśród zidentyfikowanych białek macierzy zewnątrzkomórkowej znalazły się białka takie jak: kolagen, który odpowiedzialny jest za mechaniczne właściwości aorty (elastyczność, sprężystość). Autorzy podają, że zwiększona synteza kolagenu ma kluczowe znaczenie w utrzymaniu migracji komórek, przebudowie tętnic, a także formacji wewnętrznej błony w adaptacji do uszkodzenia naczyń. Innymi zidentyfikowanymi białkami są osteoglicyna (hamuje ona syntezę kolagenu typu I w procesie fibrylinogenezy, a także utrzymuje organizację przestrzenną włókien kolagenowych), dermatopontyna (białko to reguluje proces fibrylinogenezy kolagenu), białko szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 47 kDa (Hsp 47, jest to białko retikulum endoplazmatycznego, które ułatwia wydzielanie kolagenu, a także odpowiada za jego prawidłowe fałdowanie). Ponadto autorzy

zidentyfikowali również fetuinę A, która jest silnym inhibitorem kalcyfikacji ścian naczyń krwionośnych. Jej niedobór prowadzi do zwiększenia ryzyka wapnienia w obrębie komórek mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych – jeden z głównych czynników sztywnienia naczyń.

Aby zrozumieć przebieg procesów fizjologicznych ważna jest znajomość poziomu ekspresji, struktury jak i funkcji białek. Dlatego wydaje się, że zastosowanie proteomiki w badaniach modelowych zwierząt znajduje duże uzasadnienie. Dotychczas stosowane metody badawcze w ocenie zmian procesów fizjologicznych jak i patologicznych były oparte jedynie na analizie biochemicznej płynów ustrojowych. Natomiast metody proteomiczne wykorzystywane w badaniach prowadzonych na ludziach, zwierzętach laboratoryjnych oraz gospodarskich wypełnia lukę w dokładniejszym poznaniu przebiegu wielu procesów fizjologicznych, mechanizmów ekspresji białek na poziomie translacji (Ożgo i wsp., 2014). Ponadto strategie proteomiczne wykorzystywane są w diagnostyce schorzeń układu naczyniowego, a tym samym przyczyniają się do wskazania kierunków działań prewencyjnych i profilaktycznych (Arab i wsp., 2006; Vivanco i wsp., 2003).

2.2.2. Świnia jako organizm modelowy w badaniach proteomicznych

Zwierzęta modelowe odgrywają nieocenioną rolę w badaniach biomedycznych. Podobieństwa anatomiczne i fizjologiczne między ludźmi a zwierzętami, zwłaszcza ssakami, skłoniły naukowców do zbadania szerokiego zakresu mechanizmów i oceny nowych terapii w modelach zwierzęcych (Barre – Sinoussi i Montagutelli, 2015). Aktualnie dostępna wiedza z zakresu inżynierii genetycznej na temat sekwencji genomów zwierząt i ekspresji genów, umożliwia poznawanie mechanizmów powstawania chorób i opracowywanie skutecznych metod ich leczenia (Gun i Kues, 2014; Dziegiel i wsp., 2018). Ponadto badania *in vivo* są szczególnie ważne w eksperymentach, ponieważ pozwalają dostarczyć cennych informacji związanych z bezpieczeństwem i skutecznością działania np. środków farmakologicznych czy suplementów diety. Dlatego też w badaniach biomedycznych ważnym elementem jest nie tylko sam układ doświadczania ale odpowiedni wybór modeli zwierzęcych, które stanowiłyby jak najlepsze odwzorowanie mechanizmów zachodzących w ludzkim organizmie (Dziegiel i wsp., 2018).

Ludzie oraz inne ssaki to bardzo złożone organizmy, w których narządy pełnią różne funkcje fizjologiczne w wysoce zintegrowany i regulowany sposób. Relacje obejmują złożoną sieć hormonów, krążących czynników i komórek, a także wzajemną komunikację między komórkami. Aby uzyskać pełny opis i zrozumienie mechanizmów, wymagane są badania na poziomie cząsteczek, komórek, narządów oraz funkcji fizjologicznych w warunkach zdrowych i patologicznych (Barre – Sinoussi i Montagutelli, 2015)

W ostatnich latach znacznie wzrosło wykorzystanie dużych zwierząt jako modeli w badaniach biomedycznych. Na szczególną uwagę zasługuje świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) ze względu na genetyczne, fizjologiczne i żywieniowe podobieństwa do człowieka. Anatomia, wielkość i fizjologia narządów wewnętrznych świni jest niemal identyczna. Dlatego też gatunek ten jest potencjalnie lepszym modelem dla niektórych procedur i badań w porównaniu z innymi dużymi gatunkami zwierząt czy gryzoniami. (Kuzmuk i Schook, 2011; Swindle i wsp., 2012; Bendixen, 2014).

Świnie i ludzie mają wiele podobieństw, co sprawia, że gatunek ten jest dobrze dopasowanym modelem do badania fizjologii i patologii układu krążenia. Po pierwsze średnie tętno świni wynosi 90-107 uderzeń na minutę (bpm), co sprawia, że jest ono bardzo zbliżone do tętna człowieka (70-100 bpm). Ogólny układ sercowo - naczyniowy, parametry krwi, rozmiar naczyń, naczynia wieńcowe, rozmiar ciała, tempo metabolizmu, profile lipidowe, a nawet dieta są podobne do ludzi. W porównaniu z ludźmi 60% krążącego cholesterolu u świni jest prezentowane jako lipoproteiny o niskiej gęstości, a 38% jako lipoproteiny o dużej gęstości, odpowiednio 63% i 28% (Tsang i wsp., 2016).

Ponadto gatunek ten wykorzystywany jest również w badaniach etiologii chorób neurologicznych (zaburzenia i dysfunkcja białek wywołujących chorobę Alzheimera czy Parkinsona jest identyczny jak u człowieka) układu pokarmowego, odpornościowego, wydalniczego świnie są dobrymi zwierzętami modelowymi do badań nad przebiegiem analogicznych chorób tych układów u człowieka (Walters i wsp., 2011; Bassols i wsp., 2014; Dzięgiel i wsp., 2018). Świnie ze względu na podobny do człowieka metabolizm oraz szlaki przemian na poziomie komórkowym pozwala na wykorzystanie tego zwierzęcia jako modelu w badaniu chorób metabolicznych czy otyłości. Modele świńskie wykorzystywane są również w okulistyce, a także w leczeniu ran i oparzeń (Kuzmuk i Schook, 2011). Dodatkowym atutem przemawiającym za wykorzystaniem świni jako zwierzęcia modelowego jest fakt, że gatunek ten jest łatwy w hodowli,

wykazuje wysoką płodność i plenność, a także występuje w wielu wariantach fenotypowych i genotypowych (Vodicka i wsp., 2005; Swindle i wsp., 2012).

Analizy proteomiczne różnych tkanek i układów u świń obejmują zarówno badania fizjologiczne i biomedyczne w znacznie większym stopniu niż u innych zwierząt gospodarskich. Biologiczne podobieństwo tego gatunku zwierząt do organizmu człowieka, spowodowało wykorzystanie świń w wielu procedurach badawczych poczynając od badań układu sercowo-naczyniowego, badań dotyczących biochemii organizmu, badań żywieniowych jak i również w medycynie transplantacyjnej. Biorąc pod uwagę fakt biologicznego podobieństwa, świnia jako w głównej mierze zwierzę produkcyjne jest również bardzo ważnym gatunkiem doświadczalnym, modelem wykorzystywanym do analiz biologicznych oraz przedmiotem badań i szkoleń medycznych oraz farmaceutycznych.

Nowoczesne technologie wykorzystywane w analizach genetycznych, genomicznych, oraz transkryptomicznych umożliwiły selekcję określonych cech (jakość mięsa, otluszczenie) ukierunkowaną na potrzeby konsumenta. Ponadto technologie dały możliwość wielu odpowiedzi dotyczących biologii systemowej. Przeprowadzono wiele badań dotyczących genetyki i genomiki gatunku jakim jest świnia czego konsekwencją jest wiele prac przeglądowych oraz oryginalnych. (Prather i wsp., 2013; Perleberg i wsp., 2018). Natomiast badania proteomiczne czy metabolomiczne w obecnej chwili nie mają jeszcze w pełni zastosowania w celu charakterystyki cech biologicznych, bardzo istotnych dla produkcji trzody chlewnej. Niewiele jest również prac dotyczących wykorzystania narzędzi proteomicznych w celu scharakteryzowania świńskich modeli biomedycznych na poziomie molekularnym. Proteomika może przybliżyć zatem cechy biologiczne świń i zrozumienie problemów zdrowotnych jakie pojawiają się w produkcji trzody chlewnej (Carpintero i wsp., 2007; Gutierrez i wsp., 2013; Olumee-Szabon i wsp., 2020; Gondek i wsp., 2020).

Wykorzystanie świń jako zwierząt modelowych jest również niezmiernie ważne w poszukiwaniu markerów diagnostycznych i opracowywaniu nowych środków terapeutycznych z możliwością zastosowania w medycynie człowieka (de Almeida i Bendixen, 2012).

Jedne z pierwszych badań dotyczących analiz proteomicznych z wykorzystaniem świnia jako gatunku modelowego dotyczyły biologii reprodukcyjnej tych zwierząt (Huang i wsp., 2005). Dokonano charakterystyki proteomicznej jądra świnia z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej oraz spektrometrii masowej typu MALDI-TOF. Autorzy

zmapowali 330 spotów białkowych co ma istotne znaczenie w odniesieniu do przyszłych badań proteomicznych, związanych z biologią rozwoju jak i patologią jąder. Wśród zidentyfikowanych białek stwierdzono: białka strukturalne, białka stresu cieplnego, białka metabolizmu energetycznego oraz białka związane z regulacją translacji i transkrypcji. Powell i wsp. (2010) dokonali identyfikacji białek oocytów u loch. Autorzy zidentyfikowali markery jakości oocytów oraz potencjału rozwojowego poprzez porównanie ich wysokiej i niskiej jakości.

Badania proteomiczne przeprowadzone na świnich jako zwierzętach modelowych dokonano również w kierunku poprawy produkcji jakości wieprzowiny. Kim i wsp. (2004) zidentyfikowali różnice w profilach białkowych pomiędzy proteomami białych i czerwonych mięśni szkieletowych u świni rasy Landrace i Duroc. W mięśniach czerwonych obserwowali nadekspresję łańcucha lekkiego miozyny, białka mioglobiny oraz białka szoku cieplnego o masie 20 kDa, natomiast w mięśniach białych stwierdzili nadekspresję białka szoku cieplnego o masie 70 kDa.

Analiza piśmiennictwa wskazuje na dużą ilość prac dotyczących proteomiki tkanki mięśniowej oraz płynów ustrojowych świń. Natomiast niewiele jest analiz proteomicznych dotyczących funkcjonowania poszczególnych układów, w tym układu sercowo – naczyniowego oraz wpływu różnych warunków środowiska na fizjologię organizmu. Dotyczy to również wpływu żywienia zwierząt gospodarskich na proteom poszczególnych tkanek i narządów. Dlatego też świnia może być ciekawą alternatywą m. in. w badaniach nutriproteomicznych.

Metody badawcze stosowane dotychczas w ocenie zmian procesów fizjologicznych i ich zaburzeń pod wpływem różnych diet opierały się na analizie biochemicznej krwi i moczu. Wykorzystanie metod proteomicznych w badaniach prowadzonych na zwierzętach hodowlanych umożliwi dokładniejsze poznanie przebiegu wielu procesów fizjologicznych, mechanizmów regulacji ekspresji białek na poziomie translacji. Metody proteomiczne mogą również znaleźć zastosowanie np. w diagnostyce zaburzeń funkcji układu sercowo-naczyniowego oraz przyczynić się do wskazania kierunków działań prewencyjnych i profilaktycznych podczas chowu zwierząt.

2.3. Inulina

Wprowadzenie w 2006 roku przez Unię Europejską zakazu stosowania antybiotyków (Dz.U. L 268, rozporządzenie nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego

i Rady Unii Europejskiej z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt), spowodowało poszukiwanie nowych strategii żywieniowych w przemyśle paszowym, które mogłyby pozytywnie wpłynąć na skład mikrobiomu przewodu pokarmowego zwierząt. Prowadzone są liczne badania dotyczące dodatków paszowych jako alternatywy dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu (Pejsak i Truszczyński, 2006; Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008). Badania dotyczące równowagi mikrobioty jelitowej tych zwierząt realizowane są w ramach „Europejskiej sieci ds. czynników wpływających na równowagę mikrobiomu żołądkowo-jelitowego i jego wpływu na zdrowie świń (PiGutNet)” Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (ang. COST) poddziałanie FA1401, grupa robocza 3 (Trevisi i wsp., 2015).

Szczególną uwagę poświęca się prebiotykom, które określane są jako składnik pożywienia odporny na działanie enzymów endogennych w przewodzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych, który dociera do jelita grubego w niezmienionej formie (Śliżewska i wsp., 2013). Ponadto zwraca uwagę również korzystne oddziaływanie prebiotyków na organizm gospodarza poprzez modulację zespołu mikrobioty jelitowej (Pineiro i wsp., 2008; Śliżewska i wsp. 2013). Ważną grupę związków w pełni wypełniających założenia, które powinny spełniać prebiotyki są fruktany typu inulinowego (Roberfroid, 2007). Zalicza się do nich inulinę, oligofruktozę i fruktooligosacharydy. Polisacharydy te charakteryzują się podobną budową chemiczną, ponieważ zbudowane są z cząsteczek β -fruktofuranozy i cząsteczki glukopiranozy. Natomiast różnią się stopniem polimeryzacji (DP) oraz brakiem glukozy na początku łańcucha fruktozowego w przypadku oligofruktozy (Gałązka i wsp., 2004; Jędrzejczak-Krzepkowska i Bielecki, 2011). Fruktany dzielą się na krótko- i długołańcuchowe związki. Fruktooligosacharydy i oligofruktoza zaliczane są do krótkołańcuchowych fruktanów. Oligofruktoza otrzymywana jest w wyniku częściowej hydrolizy inuliny, a stopień polimeryzacji waha się od 2 do 10 cząsteczek fruktozy, średnio wynosi 4 jednostki. Z kolei fruktooligosacharydy są krótkołańcuchowymi oligosacharydami, syntetyzowanymi z sacharozy przy użyciu enzymów o aktywności fruktozylotransferaz lub otrzymywane w wyniku hydrolizy inuliny (Roberfroid, 2007; Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008). Inulina zaliczana jest do długołańcuchowych fruktanów, jest liniowym polimerem zbudowanym z jednostek β -D-fruktozy i cząsteczki D-glukozy, połączonych ze sobą za pomocą wiązania β -(1,2)-glikozydowego. Stopień polimeryzacji inuliny waha się w przedziale od 2 do 60 jednostek fruktozy w zależności od pochodzenia,

ale najczęściej wynosi średnio 12 (Roberfroid, 2007). W zależności od stopnia polimeryzacji fruktanów mogą wywierać odmienne efekty biologiczne.

Fruktany typu inulinowego występują jako naturalny wielocukier roślin jedno- i dwuliściennych jako materiał zapasowy, który gromadzony jest najczęściej w bulwach, kłączach czy korzeniach. Najpopularniejszym źródłem występowania fruktanów są: cykoria (13-20%), topinambur (14-19%), karczochy (15-20%), szparagi (10-15%), czosnek (9-16%), cebula (2-6%) (Van Loo i wsp., 1995; Sobolewska i wsp., 2012).

Natomiast Kowalski i Wierciński (2004) podają, że zawartość fruktanów może się różnić w przypadku różnego terminu zbioru roślin, ponieważ w okresie jesiennym procentowa zawartość tych polisacharydów może być znacznie większa niż wiosną.

Głównym naturalnym źródłem fruktanów typu inulinowego pozyskiwanych na skalę przemysłową są: cykoria odmiany korzeniowej (łac. *Cichorium intybus*) i topinambur (łac. *Helianthus tuberosus*) (Alexiou i Franck, 2008). Mączka otrzymywana z korzeni odmian cykorii hodowanych w Polsce średnio zawiera około 63% inuliny oraz około 2% oligofruktanów (Gałązka, 2002). Susz z korzenia cykorii charakteryzuje się wysoką zawartością związków prebiotycznych, dlatego prowadzone są badania w kierunku wykorzystania tego dodatku jako potencjalnego suplementu w diecie świń. W swoim składzie, poza fruktanami typu inulinowego, zawiera również związki o charakterze antyoksydacyjnym m.in. polifenole (Judžentiene i Budiene, 2008). Ponadto fruktany mogą być również syntetyzowane przez bakterie *Streptococcus mutans* oraz grzyby *Aureobasidium pullulans* i *Aspergillus niger* (Ritsema i Smeekens 2003; Skowronek i wsp., 2003).

2.3.1 Wpływ fruktanów typu inulinowego na fizjologię różnych tkanek u zwierząt i ludzi

Właściwości prebiotyczne fruktanów związane są przede wszystkim z występowaniem w ich strukturze chemicznej wiązań β -(1-2)-glikozydowych, które powodują, że związki te są odporne na działanie endogennych enzymów znajdujących się w przewodzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych (Gramza-Michałowska i Górecka, 2009). W konsekwencji związki te docierają do jelita grubego w niezmienionej formie, gdzie zostają poddane selektywnej i szybkiej fermentacji bakteryjnej. Wykazano, że fermentacja fruktanów typu inulinowego jest zależna od stopnia polimeryzacji oraz poziomu suplementacji i jest zapoczątkowana w jelicie cienkim świń (Yasuda i wsp.,

2009). Głównym jednak miejscem fermentacji fruktanów typu inulinowego tych zwierząt jest jelito ślepe oraz okrężnica (Barszcz i wsp., 2018). W wyniku tego procesu następuje wzrost korzystnej flory bakteryjnej, głównie z rodzaju *Bifidobacterium* oraz w mniejszym stopniu pałeczek kwasu mlekowego (*Lactobacillus*). Skutkiem fermentacji bakteryjnej fruktanów jest wzrost populacji bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym (Patterson i wsp., 2010; Pałlack i wsp., 2015; Barszcz i wsp., 2018). Efekty fermentacji w jelicie cienkim są stosunkowo słabo poznane, natomiast dobrze poznane są jej skutki w jelicie grubym. Dzięki wzrostowi liczby tych drobnoustrojów, zostaje zahamowany rozwój bakterii potencjalnie chorobotwórczych, poprzez obniżenie pH treści jelitowej, ponadto jest większa konkurencja o substraty i miejsce adhezji na nabłonku jelitowym (Roberfroid, 2007; Cieślik i Gębusia, 2011). Produktami końcowymi fermentacji fruktanów są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KKT), takie jak kwas propionowy, octowy, masłowy. KKT obniżają pH treści pokarmowej, przez co zahamowany jest rozwój mikroorganizmów patogennych z rodzaju *Clostridium* oraz rodziny *Enterobacteriaceae*, również bakteriocyny produkowane przez bifidobakterie przyczyniają się do ograniczenia bakterii chorobotwórczych (Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008). Ponadto KKT powodują zwiększenie wysokości kosmków jelitowych, a tym samym zwiększenie powierzchni wchłaniania substancji odżywczych oraz stanowią źródło substratów energetycznych dla kolonocytów (Sobolewska i wsp., 2012). Głównym składnikiem odżywczym jest kwas masłowy, który pobudza wzrost i proliferację komórek, które wyściełają nabłonek jelitowy (Kulczyński i Gramza-Michałowska, 2016). Kotunia i wsp., 2010 podają, że kwas masłowy przyczynia się również do zwiększenia głębokości krypt jelitowych.

Wynikiem działania produktów fermentacji bakteryjnej są efekty jelitowe oraz ogólnoustrojowe. Do efektów jelitowych należy wzrost bakterii symbiotycznych, ograniczenie wzrostu bakterii patogennych oraz zmiany architektury błony śluzowej jelita związane z wydłużeniem kosmków jelitowych oraz spłyceniem krypt jelitowych (Pierce i wsp., 2006; Lu i wsp., 2008; Wen i wsp., 2012). Do innych efektów jelitowych według Diao i wsp. (2017, 2019) zaliczyć można uszczelnienie bariery jelitowej. Jest to wynikiem zwiększonej sekrecji mucyn 1 oraz 2 stymulowanej przez KKT, a także indukcji ekspresji głównych białek tworzących połączenia zamykające: zonuliny-1, okludyny i kładyny-1 oraz 4 w jelicie cienkim, jak i okrężnicy u świń (Diao i wsp., 2019; Zhang i wsp., 2019). KKT absorbowane są przez kolonocyty z czego większość kwasu masłowego wykorzystywana jest przez te komórki jako substrat energetyczny. Pozostała

część KKT transportowana jest do krwi, żyłą wrotną do wątroby (Canfora i wsp., 2015). KKT mają wpływ na komórki jelit oraz na komórki narządów peryferycznych (wątroby, nerek oraz mięśni szkieletowych) przez swoiste receptory GRP41 oraz GRP43 (obecnie nazywane FFAR3 oraz FFAR2 – ang. *Free Fatty Acid Receptors*). Konsekwencją tego działania jest szereg efektów o charakterze metabolicznym. Demigné i wsp. (1995) oraz Jiao i wsp. (2018) wykazali, że KKT mogą hamować aktywność syntazy kwasów tłuszczowych w wątrobie. Hara i wsp. (1999) wskazują na inhibicyjny wpływ KKT na główne enzymy szlaku syntezy cholesterolu.

Wydaje się, że uzyskane do tej pory wyniki badań są w dalszym ciągu nie wystarczające do pełnego poznania wpływu prebiotyków, a w szczególności roślin bogatych w inulinę, na funkcjonowanie organizmu zwierząt na poziomie tkanek i narządów. Wyniki wielu badań wskazują, że suplementacja błonnika pokarmowego w diecie może modulować skład mikroflory jelitowej, a tym samym oddziaływać z fizjologią wielu tkanek i narządów organizmu gospodarza. Dotyczy to w szczególności fruktanów typu inulinowego, które są sklasyfikowane jako prebiotyki.

W badaniach Lepczyńskiego i wsp. (2015) suplementacja diety rosnących prosiąt 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii istotnie wpłynęła na ilościowy skład proteomu surowicy krwi badanych zwierząt. Uzyskane różnice w profilach białkowych pomiędzy grupą kontrolną a doświadczalną dotyczyły trzech grup białek zaangażowanych w procesy: immunologiczne; metabolizm cholesterolu, a także proces krzepnięcia krwi. W doświadczeniu wykazano obniżenie ekspresji białek związanych z odpowiedzią ostrej fazy: białka C-reaktywnego (CRP); białka wiążącego komponent dopełniacza C4 (C4BP); komponent dopełniacza C6 (C6) oraz rozpuszczalnej formy białka antygenowego CD14 (sCD14). Zdaniem autorów obniżenie koncentracji białek CRP oraz sCD14 może świadczyć o szybszym osiągnięciu funkcjonalnej dojrzałości przewodu pokarmowego w grupie suplementowanych zwierząt. Wykazano bowiem, że koncentracja sCD14 silnie koreluje ze zmianami szczelności bariery jelitowej spowodowanej podażą diety wysokotłuszczowej ubogiej we włókno pokarmowe (Tabung i wsp., 2017). W badaniach Lepczyńskiego i wsp. (2015) wykazano również niższą koncentrację fibrynogenu w surowicy krwi zwierząt suplementowanych inuliną, w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej. Ponadto, u suplementowanych zwierząt obserwowano istotny wzrost ekspresji białek ściśle związanych z układem krzepnięcia tj.: antytrombiny III (ATIII) oraz witronektyny (VT).

Analiza proteomu wątroby rosnących świń, wykazała że, pod wpływem suplementacji diety inuliną o polimeryzacji wynoszącej średnio 10-12 reszt fruktozowych, (z uwzględnieniem zróżnicowanego poziomu suplementacji na poziomie 1 oraz 3%), doszło do stymulacji ekspresji białek (CES-1, ALDH2, GPDH-C) zaangażowanych w kontrolę wątrobowego poziomu trójglicerydów oraz cholesterolu. Zmiany ekspresji tych białek znajdują odzwierciedlenie w wyższych koncentracjach zarówno cholesterolu całkowitego, jak i trójglicerydów w wątrobach prosiąt żywionych suplementowanymi dietami. Stwierdzono jednocześnie obniżenie koncentracji cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji związanej z HDL w osoczu krwi tych zwierząt, a różnice w koncentracji tych wskaźników były zależne od poziomu suplementacji (Herosimczyk i wsp., 2017). Natomiast Lepczyński i wsp. (2017) dokonali analizy wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na poziom ekspresji białek wchodzących w skład proteomu wątroby. Analiza proteomu wątroby z wykorzystaniem elektroforezy 2DE oraz spektrometrii masowej MALDI TOF wykazała istotny wpływ suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na zmiany ekspresji białek w szczególności związanych z metabolizmem energetycznym. Ponadto stwierdzono aktywację mechanizmów związanych z zapobieganiem uszkodzenia funkcji wątroby m.in. w wyniku stresu oksydacyjnego, czy też innych czynników stymulujących stan zapalny.

Analiza profili białkowych błony śluzowej jelita krętego wykazała istotne różnice wynikające z suplementacji diety świń fruktanami typu inulinowego zarówno w formie natywnej inuliny, jak i suszu z korzenia cykorii. Główne różnice obserwowano w przypadku białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny, proces proliferacji, a także organizacji cytoszkieletu komórkowego. Ponadto, obserwowano różnice w relatywnej koncentracji białka związanego ze statusem żelaza w organizmie świń (Herosimczyk i wsp., 2018; Lepczyński i wsp., 2019).

Lamers i wsp. (2003) wykazali, że pod wpływem natywnej inuliny, w komórkach jelita cienkiego wzrastała koncentracja glukozy, glutaminianu oraz alaniny. Na uwagę zasługuje stwierdzony wzrost syntezy glutaminianu, mający wpływ na utrzymanie integralności bariery jelitowej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku reorganizacji nabłonka jelitowego w wyniku stresu m.in. odsadzeniowego, a także ze wzrostem wchłaniania jonów z przewodu pokarmowego (Wang i wsp., 2015). Stwierdzono ponadto wzrost ekspresji białek związanych z cytoszkieletem aktynowym, zaangażowanych w utrzymanie integralności i szczelności bariery jelitowej w grupie zwierząt żywionych

suszem z korzenia cykorii. Należy podkreślić, iż w wielu badaniach potwierdzono pozytywny wpływ suplementacji diety fruktanami typu inulinowego na uszczelnianie bariery jelitowej poprzez wzrost ekspresji białek formujących połączenia zwierające (Diao i wsp., 2017; Wu i wsp., 2017). Obserwowano zmiany ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie stabilności i formowania tych połączeń. Należą do nich białko spokrewnione z aktyną 3 (ACTR3) oraz aneksyna 2 (ANXA2). ACTR3 jest białkiem kluczowym do utrzymania i formowania połączeń zwierających nabłonek jelitowy (Bernadskaya i wsp., 2011).

W badaniach Robak i wsp. (2019) stwierdzono wpływ diety z wodnym wyciągiem inuliny oraz suszu z korzenia cykorii na zmiany profilu białkowego kory i rdzenia nerek rosnących świń. Suplementacja diety z dodatkiem inuliny spowodowała zmiany w ekspresji białek kory i rdzenia nerek zaangażowanych w metabolizm energetyczny, białek szoku cieplnego i innych białek opiekuńczych. Ponadto stwierdzono zmiany w ekspresji białek cytoszkietarnych i związanych z organizacją cytoszkietetu.

Wiadomo, że mikrobiota jelitowa odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu funkcji jelit gospodarza, poprzez uwalnianie i/lub transformację metabolitów (np. kwasów żółciowych i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych), które regulują funkcje hormonalne jelit.

Długoletnie badania wielu autorów wskazują, że suplementacja błonnika pokarmowego może modulować skład mikroflory jelitowej, a tym samym oddziaływać na fizjologię gospodarza. Dotyczy to w szczególności fruktanów typu inulinowego, które są sklasyfikowane jako prebiotyki.

Analiza przeglądu piśmiennictwa wskazuje na niewielką ilość prac w kontekście wpływu mikrobioty jelitowej na układ sercowo-naczyniowy. Jak podaje Catry i wsp. (2018) mikrobiota jelitowa może być uważana za organ „zewnątrzny” odgrywający ważną rolę w funkcjonowaniu i strukturze tkanek i narządów gospodarza. **Autorzy po raz pierwszy wykazali, że fruktany typu inulinowego regulują funkcję i poprawiają dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych u myszy. Zdaniem autorów jeśli zostanie to potwierdzone u ludzi, prebiotyki można zaproponować jako nowe podejście w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym związanym z zaburzeniami metabolicznymi.**

Zakłada się, że naczynia krwionośne reagują na różne warunki i wymagania funkcjonalne poprzez ciągłe adaptacyjne zmiany strukturalne. Jak wskazują badania Catry i wsp. (2018) po zastosowaniu fruktanów typu inulinowego u myszy w celu

zapewnienia stabilnej adaptacji naczyniowej obserwowano wzrost średnicy tętnicy krezkowej i grubości ścian związany ze wzrostem reaktywności skurczowej. Zmiany funkcjonalności naczyń krwionośnych nie ograniczały się do jelitowego drzewa naczyniowego. Efekty diety inulinowej obserwowano również w pewnej odległości od łożyska krezkowego, na co wskazywało odzyskanie krążącego poziomu hemoglobiny nitrozylowanej (Hb-NO) we krwi obwodowej i poprawa relaksacji w tętnicach szyjnych. Autorzy podają również iż, obserwowane lokalnie korzystne przemodelowanie zewnętrzne naczyń krwionośnych charakteryzowało się poprawą relaksacji śródbłonna zależnej od tlenu azotu (NO). Związane to jest ze wzrostem bakterii wytwarzających NO po podaniu fruktanów typu inulinowego. **Wszystkie zebrane dane autorów pozwoliły wysunąć koncepcję stwierdzającą, że zmiana mikrobioty jelitowej ma ogromny wpływ na kluczowe funkcje jelit, co w konsekwencji związane jest z prawidłową gospodarką kardiometaboliczną gospodarza.**

Fruktany wywierają pozytywny efekt na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego poprzez regulowanie gospodarki lipidowej, powodując obniżenie „złego cholesterolu” (frakcji LDL) oraz triglicerydów w surowicy u ludzi i zwierząt (Delzenne i wsp., 1993; Fiordaliso i wsp., 1995; Nowak i wsp., 2012). Fruktany mogą w różny sposób regulować równowagę lipidową, np. poprzez hamowanie ekspresji enzymów wątrobowych (karboksylaza acetylo-CoA, dehydrogenaza-6-fosforanowa i syntaza kwasów tłuszczowych), które zaangażowane są w syntezę lipidów *de novo* (Delzenne i Kok, 2001). Ponadto związki te mogą wpływać na zwiększenie aktywności lipazy lipoproteinowej w tkance mięśniowej (Kulczyński i Gramza-Michałowska, 2016). Innym mechanizmem działania fruktanów na poziom cholesterolu we krwi jest wiązanie kwasów żółciowych w jelicie, co powoduje zwiększenie ich wydalania. W wyniku tego zmniejszona jest ilość soli żółciowych oraz ograniczone jest wchłanianie lipidów, co może przyczyniać się do zmniejszenia powstawania blaszki miażdżycowej (Anderson i Hanna, 1999; Kaur i Gupta, 2002). Davidson i wsp. (1998) badali wpływ spożycia diety niskotłuszczowej z dodatkiem inuliny (18g/dzień przez 6 tyg.) na poziom cholesterolu we krwi w grupie mężczyzn i kobiet. Badania wykazały, że spożywanie diety spowodowało obniżenie poziomu frakcji LDL cholesterolu w obu grupach (u mężczyzn o 7,4%, u kobiet o 12,3%). Natomiast Letexier i wsp. (2003) przeprowadzili badania na grupie ochotników, którzy otrzymywali dietę wysokowęglowodanową i niskotłuszczową z dodatkiem inuliny (10g/dzień) przez okres 3 tygodni. Autorzy zaobserwowali, że spożywanie tej diety spowodowało zmniejszenie stężenia trójglicerydów we krwi oraz

zmniejszenie syntezy triglicerydów w wątrobie. Ciekawe doświadczenie przeprowadzili Correia-Sa i wsp. (2013) na grupie mężczyzn, u których stwierdzono podwyższony poziom cholesterolu we krwi, którym przez 3 tygodnie podawano lody z dodatkiem 20g inuliny. Badania wykazały znaczne obniżenie poziomu triglicerydów we krwi o 40 mg/dL. Natomiast Kim i Shim (1999) badali wpływ dodatku wodnego wyciągu z cykorii lub dodatku 5% inuliny na zmiany poziomu cholesterolu u szczurów. Autorzy zaobserwowali, że zastosowanie preparatów znacząco wpłynęło na obniżenie poziomu frakcji LDL i istotny wzrost poziomu „dobrego cholesterolu” (frakcji HDL). W kolejnych badaniach na szczurach Kim (2000) zastosował perfuzję wodnym wyciągiem z cykorii (10g/L)(preparat A) lub inuliną (10g/L)(preparat B), ponadto preparaty te zawierały 2mmol/L cholesterolu. Autor zaobserwował, że zastosowanie preparatu A spowodowało zmniejszone wchłanianie cholesterolu w odcinku czczym jelita o 30%, a w odcinku jelita krętego o 41%. Podobnie zastosowanie preparatu B wpłynęło hamująco na wchłanianie cholesterolu w obu odcinkach jelita (czcze o 39%, kręt o 51%). Natomiast Mortensen i wsp. (2002) w swoich badaniach na myszach sprawdzali wpływ diety wzbogaconej o 10% dodatek inuliny na zmiany profilu lipidowego osocza krwi. Suplementacja diety prebiotykiem spowodowała obniżenie cholesterolu całkowitego we krwi, a także frakcji LDL, natomiast w przypadku trójglicerydów oraz frakcji HDL inulina nie spowodowała zmian w ich stężeniu. Badania dotyczące zmian profilu lipidowego pod wpływem zastosowania inuliny zostały przeprowadzone przez Hana i wsp. (2013). Autorzy eksperyment przeprowadzili na trzech grupach szczurów, które otrzymywały dietę wysokotłuszczową z dodatkiem inuliny o różnym stopniu polimeryzacji (grupa A inulina o DP=10; grupa B inulina o DP=15; grupa C inulina o DP=24). Han i wsp. (2013) zaobserwowali, że dieta grup B i C spowodowała zmniejszenie się poziomu cholesterolu całkowitego i trójglicerydów, natomiast efektu takiego nie zaobserwowano w przypadku grupy A.

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć również informacje na temat wpływu diety fruktanowej na zmiany profilu lipidowego u świń, które mogą budzić niewielkie kontrowersje. Herosimczyk i wsp. (2015) oraz Lepczyński i wsp. (2015) podają, że dodatek wodnego ekstraktu inuliny do paszy prosiąt nie spowodował statystycznie istotnych zmian w poziomie stężenia cholesterolu całkowitego, a także jego poszczególnych frakcji (LDL, HDL). Natomiast w doświadczeniu Greli i wsp. (2014) wzbogacenie diety świń wodno-alkoholowym wyciągiem inuliny i suszu z korzenia roślin bogatych w inulinę przyczyniło się do zmniejszenia zawartości cholesterolu całkowitego

i frakcji LDL, co więcej autorzy zaobserwowali wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu we krwi. Natomiast Lepczyński i wsp. (2015) przeprowadzili badania dotyczące wpływu suplementacji diety suszem z korzenia cykorii dla prosiąt, w których wyniki wskazują, że spożycie paszy eksperymentalnej spowodowało obniżenie poziomu triglicerydów w osoczu.

Od kilkudziesięciu lat stosowanie fruktanów typu inulinowego budzi ogromne zainteresowanie wśród naukowców. Jeszcze do niedawna badania skupione były na wpływie tych niestrawnych polisacharydów przede wszystkim na poprawie wskaźników mikrobiologicznych i morfologicznych jelit (Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008).

Badania przeprowadzone przez Nemcovą i wsp. (1999) na prosiętach pokazały, że dodatek do paszy zwierząt fruktooligosacharydów spowodował zwiększenie liczby bakterii *Lactobacillus* i *Bifodobacterium*, a także obniżenie mikroorganizmów niepożądanych takich jak *Clostridium* oraz *Enterobacteriaceae*. Podobnie w badaniach Pattersona i wsp. (2010) oraz Sabater-Molina i wsp. (2011) stwierdzono korzystny wpływ stosowania fruktooligosacharydów u prosiąt i dorosłych świń. W doświadczeniu na świniami od 6 do 12 tygodnia życia, którym podano dietę z dodatkiem 3% inuliny także zaobserwowano wzrost bifidobakterii (od 13 do 40%) (Loh i wsp., 2006). Natomiast dodatek 1,5% inuliny do paszy dla warchlaków przyczynił się do zwiększenia wysokości kosmków jelitowych w odcinku czczym oraz wpłynął na podwyższenie stosunku kosmków jelitowych do głębokości krypt w części dwunastniczej (Pierce i wsp., 2006). Hensen i wsp. (2011) sprawdzali wpływ dodatku inuliny (0; 20; 40; 80 g/kg) na występowanie objawów świńskiej dyzenterii. Autorzy stwierdzili, że suplementacja diety 80g/kg inuliny w paszy redukuje ryzyko wystąpienia i świń dyzenterii, prawdopodobnie poprzez modyfikację fermentacji przez drobnoustroje w jelicie grubym.

Analiza piśmiennictwa wskazuje na niewielką ilość prac dotyczących wpływu fruktanów typu inulinowego na funkcjonowanie układu naczyniowego. Niemniej jednak istnieją doniesienia o wpływie fruktanów typu inulinowego na zmianę mikroflory bakteryjnej stymulując jednocześnie fizjologię gospodarza poprzez prawidłową modulację funkcji naczyń krwionośnych (Fava i Touhy, 2017; Catry i wsp., 2018).

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu suplementacji diety fruktanami typu inulinowego na zmiany proteomu aorty u rosnących prosiąt w trzech grupach doświadczalnych.

Założenia zasadniczego celu pracy zostaną osiągnięte poprzez realizację celów szczegółowych w tym:

1. Utworzenie reprezentatywnych map białkowych aorty rosnących prosiąt.
2. Identyfikacja różnic w profilach białkowych aorty w trzech grupach doświadczalnych.
3. Odniesienie różnic w ekspresji białek do procesów fizjologicznych, w które są zaangażowane.
4. Zbadanie wpływu diety wzbogaconej o fruktany typu inulinowego na wybrane wskaźniki biochemiczne tkanki (cholesterol całkowity, trójglicerydy) oraz określenie zależności pomiędzy tymi wskaźnikami, a białkami wykazującymi zmiany w ekspresji w analizowanych tkankach.

3.1. Hipoteza badawcza

Hipoteza badawcza zakłada, że suplementacja diety inuliną w formie natywnej oraz w postaci suszu z korzenia cykorii istotnie moduluje skład białkowy aorty u rosnących prosiąt.

4. Materiał i metody

4.1. Materiał badawczy

Badania zostały przeprowadzone na materiale biologicznym (aorta wstępująca), pobranym od dwudziestu czterech prosiąt, 50 – dniowych mieszańców komercyjnych linii świń PIC x Penarlan P76 (samce). Zgoda na pobranie materiału do badań została wydana przez III Lokalną Komisję Etyczną do spraw badań na zwierzętach w Szczecinie (Nr 13/2012 z dnia 23.05. 2012). Zwierzęta w trakcie trwania doświadczenia utrzymywane były w ujednoliconych, kontrolowanych warunkach środowiskowych w zwierzętarni Zakładu Podstaw Żywienia Zwierząt Monogastrycznych, Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie. Prosięta zostały podzielone losowo na trzy grupy doświadczalne liczące po 8 osobników. Zwierzęta od momentu urodzenia do odsadzenia (28 dzień życia) utrzymywane były przy lochach.

4.2. Dieta eksperymentalna

Żywienie paszami doświadczalnymi rozpoczęto przy losze od 14 dnia życia prosiąt. Zwierzęta miały wolny dostęp do paszy stałej, przewidzianej dla poszczególnych grup eksperymentalnych. Grupa kontrolna (K) otrzymywała dietę standardową, grupa pierwsza doświadczalna (D1) otrzymywała dietę standardową z 2% dodatkiem wodnego roztworu inuliny (Orafti®GR, BENEIO GmbH, Mannheim, Niemcy), grupa druga doświadczalna (D2) otrzymywała 4% dodatek suszu z korzenia cykorii do diety standardowej (tabela 1). Suplementacji dokonano na koszt udziału skrobi kukurydzianej (grupa D1 i D2) oraz częściowo kosztem pszenicy (grupa D2), odpowiednio w stosunku do dodatku fruktanów i suszu. W doświadczeniu zastosowano inulinę o średnim stopniu polimeryzacji ≥ 10 . Pełny skład pasz doświadczalnych podano w tabeli 1.

Tabela 1. Skład diety w trzech grupach żywieniowych; grupa K – kontrola, grupa D1 – eksperymentalna z 2% dodatkiem wodnego wyciągu inuliny, grupa D2 – eksperymentalna z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii.

Skład diety (%)	Grupa K	Grupa D1	Grupa D2
Pszenica	46,84	46,84	45,84
Jęczmień	20	20	20
Skrobia kukurydziana	3,0	1,0	-
Soja pełnotłusta ekstrudowana	5,9	5,9	5,9
Serwatka suszona słodka	9,7	9,7	9,7
Mączka rybna	4,0	4,0	4,0
Suszona plazma krwi	4,0	4,0	4,0
Olej sojowy	3,4	3,4	3,4
Mrówczan wapnia	0,3	0,3	0,3
Kreda pastewna	0,5	0,5	0,5
Monofosforan wapnia	0,6	0,6	0,6
Chlorek sodu	0,07	0,07	0,07
L-lizyna	0,61	0,61	0,61
D,L-metionina	0,23	0,23	0,23
L-treonina	0,26	0,26	0,26
L-tryptofan	0,09	0,09	0,09
Premix dla tuczników ¹	0,4	0,4	0,4
Aromat LUCTA 44279-1	0,1	0,1	0,1
Inulina	-	2	-
Susz z korzenia cykorii	-	-	4

¹ Skład premixu na kg: wit. A 600 000 IU, wit. D360 000 IU, wit. E 3000 mg, wit. K3 120 mg, wit. B1 120 mg, wit. B2 240 mg, wit. B6 240 mg, niacyna 1600 mg, kwas pantotenowy 800 mg, kwas foliowy 160 mg, biotyna 10 mg, wit. B12 1.6 mg, chlorek choliny 12 g, Mg 0.8 g, Fe 6 g, Zn 5.6 g, Mn 2.4 g, Cu 6.4 g, I 40 mg, Se 16 mg, Co 16 mg.

W 50 dniu życia, zwierzęta zostały poddane ubojowi zgodnie z procedurą zaakceptowaną przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na zwierzętach. Po uboju od zwierząt wypreparowano aortę. Tkanki aorty zostały dwukrotnie opłukane w schłodzonym (4°C) 0,9% roztworze NaCl, a następnie opłukane w buforze Krebs-HEPES (20mM, pH 7,4) w celu oczyszczenia i usunięcia pozostałości krwi rezydualnej. Oczyszczone tkanki osuszono i umieszczono w ciekłym azocie w celu zabezpieczenia przed proteolizą, a następnie umieszczono w temperaturze -80°C do momentu wykonania dalszych analiz.

4.3. Rozdział białek z użyciem elektroforezy dwukierunkowej

4.3.1. Homogenizacja tkanki aorty

W pierwszym etapie tkanki aorty zostały poddane homogenizacji za pomocą ceramicznego moździerza w obecności ciekłego azotu. Następnie uzyskany homogenat umieszczono w probówkach, do których dodano po 2 stalowe kulki i 1 ml buforu lizującego (7M mocznik, 2M tiomocznik, 4% CHAPS), w celu rozpuszczenia homogenatu. Probówki umieszczono w homogenizatorze mechanicznym (Qiagen Tissue Lyser) na okres 50 min przy częstotliwości 20 Hz. W kolejnym etapie próby zabezpieczono przed proteolizą poprzez dodanie inhibitorów endogennych proteaz (10 μ l/1 ml buforu), a następnie wirowano przez 20 min w temperaturze 0°C przy prędkości 22000g. Uzyskany supernatant przeniesiono do nowych probówek i umieszczono w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. W kolejnym etapie w próbach została określona koncentracja białka z użyciem komercyjnego zestawu Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad).

4.3.2. Ogniskowanie izoelektryczne (IEF – ang. *isoelectric focusing*)

W pierwszym etapie przeprowadzono rehydratację pasków poliakrylamidowych (IPG) o długości 24 cm i liniowym gradiencie pH 3-10. W tym celu na każdy pasek zostało naniesiono 650 μ l próby wraz z buforem, w której ilość białka wynosiła 1100 μ g. Proces rehydratacji został przeprowadzony w dwóch etapach. W pierwszym etapie paski zostały poddane rehydratacji pasywnej (7h, temp. 20°C, 0V), a następnie rehydratacji aktywnej przez 12 h, w temperaturze 20°C przy napięciu 50V. Po zakończonym procesie rehydratacji białka zostały rozdzielone według ich punktu izoelektrycznego (I_p) w procesie ogniskowania izoelektrycznego. Proces ten został przeprowadzony według procedury dla określonej tkanki: 150V przez 150Vh, 250V przez 150Vh, 500V przez 500Vh, 1000V przez 1000Vh, 2,5h – przy liniowym wzroście napięcia od 1000V do 5000V, a następnie 90000Vh przy napięciu 5000V. Każdy etap rozdziału prowadzony był w temperaturze 20°C oraz stałym natężeniu prądu wynoszącym 50 μ A na każdy pasek. Po zakończonym procesie ogniskowania paski IPG zostały poddane procesowi równoważenia. W tym etapie wykorzystano dwa bufony (tabela 2) w celu zredukowania (DTT) i alkilacji białek (jodoacetamid), a także nadania białkom jednakowego, ujemnego ładunku elektrycznego (SDS) aby zapewnić równomierną migrację w polu elektrycznym,

niezależnie od ich właściwości. Paski równoważono przez 15 min w buforze nr 1, a następnie w buforze nr 2 przez 20 min.

Tabela 2. Skład buforów do równoważenia pasków IPG.

Bufor nr 1	Bufor nr 2
6M mocznik	6M mocznik
30% glicerol	30% glicerol
10% SDS	10% SDS
0,5M TRIS, pH 6,8	0,5M TRIS, pH 6,8
1% DTT	2,5% jodoacetamid

4.3.3. Rozdział białek według masy molekularnej (SDS – PAGE)

W drugim etapie elektroforezy dwukierunkowej białka zostały rozdzielone według ich mas cząsteczkowych. W tym celu zrównoważone paski IPG umieszczono na szczytach 12% żeli poliakrylamidowych, a następnie przytwierdzono je 0,5% żelem agarozowym. Na żełe został również nałożony marker masy molekularnej (Precision Plus Protein Standard Plugs, Bio-Rad). Tak przygotowane żełe zostały umieszczone w buforze migracyjnym (25 mM TRIS, 192 mM glicyna, 0,1 % SDS). Proces rozdziału białek przebiegał dwuetapowo: w pierwszym etapie wykorzystano napięcie 40V przez 3,5h tak, aby białka zmigrowały z paska do żelu poliakrylamidowego. Następnie przyłożono napięcie 100V przez 17,5 h w celu właściwego rozdzielenia białek według ich masy molekularnej. Proces rozdziału odbywał w stałej temperaturze 15°C w komorze PROTEAN plus dodeca-cell (Bio-Rad).

4.4. Detekcja białek na żelach 2-D oraz archiwizacja żeli

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, żełe zostały poddane procesowi barwienia za pomocą błękitu Coomassie G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250). W pierwszym etapie żełe trzykrotnie płukano w wodzie destylowanej przez 5 min, a następnie umieszczono w buforze utrwalającym (50% alkohol etylowy, 3% kwas ortofosforowy, woda destylowana) na okres 3 godzin. W kolejnym kroku żełe umieszczono na okres 3 godzin we właściwym buforze barwiącym, który zawierał 1%

(w/v) błękit Coomassie G-250. W ostatnim etapie żele umieszczono na 45 min. w buforze odbarwiającym (10% alkohol etylowy, 2,5% kwas ortofosforowy, woda destylowana). Wybarwione żele umieszczono w wodzie destylowanej na całą noc, a następnie zeskanowano za pomocą kalibrowanego densytometru optycznego GS 800TM (Bio-Rad).

4.5. Analiza bioinformatyczna żeli 2-D

Obrazy cyfrowe żeli 2-D zostały poddane analizie bioinformatycznej za pomocą oprogramowania komputerowego PDQuest Advanced 8.0.1. Za pomocą tego programu został określony współczynnik zmienności (CV) wewnątrz grup, a także oceniono różnice w ekspresji spotów białkowych pomiędzy żelami 2-D grup replikacyjnych. Istotność różnic w ekspresji spotów oceniono za pomocą testu t-Studenta zintegrowanego z programem PDQuest Advanced 8.0.1, co umożliwiło wskazanie białek o statystycznie istotnych różnicach w ekspresji ($p \leq 0,05$).

4.6. Identyfikacja spotów białkowych za pomocą spektrometrii masowej MALDI – TOF

Wybarwione spoty białkowe błękitem Coomassie zostały poddane identyfikacji za pomocą spektrometru masowego typu MALDI – TOF. W pierwszym etapie spoty wycięto z żelu, a następnie inkubowano w buforze (25 mM dwuwęglan amonu, 50% acetonitryl, woda destylowana) przez 20 minut, w celu pozbycia się barwnika. Czynność tę powtórzono dwukrotnie. W kolejnym etapie odbarwione spoty inkubowano 10 min w obecności acetonitrylu (100%) w celu eliminacji wody ze spotów. Następnie bufor usunięto, a pozostałości acetonitrylu odparowano za pomocą koncentratora (Concentrator 5301 Eppendorf).

Przygotowane w ten sposób spoty w kolejnym etapie inkubowano z trypsyną (Promega), która hydrolizuje wiązania peptydowe na końcu -C reszt L-argininy i lizyny. Uzyskana w ten sposób mieszanina peptydów posiada co najmniej jedną resztę zasadową, dzięki której dużo łatwiej ulega jonizacji. Do każdej próbki ze spotem dodano po 8 μ l roztworu trypsyny, a następnie umieszczono w cieplarni w temperaturze 37°C przez minimum 6 godzin. Roztwór trypsyny przygotowano poprzez rozpuszczenie zliofilizowanego enzymu w 40 mM buforze dwuwęglanu amonu.

W kolejnym etapie do spotów dodano 10 μ l acetonitrylu (100%), a następnie umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 10 min. w celu ekstrakcji peptydów. Przed nałożeniem prób na stalową płytkę (MSP AnchorChip 600/96, Bruker Daltonics) przygotowano roztwór matrycy α -CHCA (kwas α -cyjano-4- hydroksycynamonowy). Matrycę (5 mg) rozpuszczono w 1 ml buforu (0,1 % kwas trifluorooctowy, 50% acetonitryl), a następnie wirowano przez 2 min. z prędkością 3000 rpm. W kolejnym etapie na płytce zmieszano 1 μ l próby i 1 μ l matrycy, a także nałożono kalibrant (Peptide Calibration Standard II), który stanowił mieszaninę peptydów w zakresie mas 700 – 3200 Da. Płytkę pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu całkowitego skryzalizowania prób. Następnie płytkę umieszczono w spektrometrze masowym, gdzie próby zostały zjonizowane za pomocą lasera (20 Hz) i poddane detekcji. Jony poruszają się z różną prędkością do detektora, ponieważ mają zróżnicowany stosunek masy do ładunku (m/z). Spektrometr mierzy czas przelotu i podaje charakterystyczną dla danego jonu (fragmentu białka) liczbę, która odzwierciedla stosunek masy do ładunku (m/z). Uzyskane na tej podstawie widma masowe zostały porównane z sekwencjami białkowymi, które dostępne są w bazach danych NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SWISSProt (<http://us.expasy.org/uniprot/>) poprzez zastosowanie przeglądarki MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Uzyskane wyniki identyfikacji spotów białkowych weryfikowano uwzględniając wynik SCORE (wiarygodność identyfikacji), procent pokrycia sekwencji aminokwasowej (min. 20 %), a także porównanie teoretycznych wartości mas cząsteczkowych (MW) i punktów izoelektrycznych (pI) białek z uzyskanymi wartościami eksperymentalnymi.

4.7. Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych białek

Zidentyfikowane białka zostały poddane analizie z wykorzystaniem bazy danych STRING v.11 (<https://string-db.org/>), w celu określenia udziału białek w procesach biologicznych, pełnionych funkcji molekularnych oraz określenie szlaków metabolicznych, w które zaangażowane są białka. Ponadto za pomocą wyszukiwarki Euk-mPlock 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi/>) oraz bazy danych UniProt (<http://www.uniprot.org/>) określono lokalizację komórkową zidentyfikowanych białek aorty.

4.8. Oznaczenia cholesterolu i trójglicerydów tkanki aorty

Do oznaczenia poziomu cholesterolu i trójglicerydów wykorzystano 0,5 g tkanki, którą poddano homogenizacji w schłodzonym buforze PIPES (0,05 mmol/l) o pH 7.0, a następnie wirowano przez 30 min. w 4°C i prędkości 12.850g. Koncentrację cholesterolu i trójglicerydów oznaczono metodą kolorymetryczną wykorzystując komercyjny zestaw (ELITech Group France).

4.9. Analiza statystyczna wyników

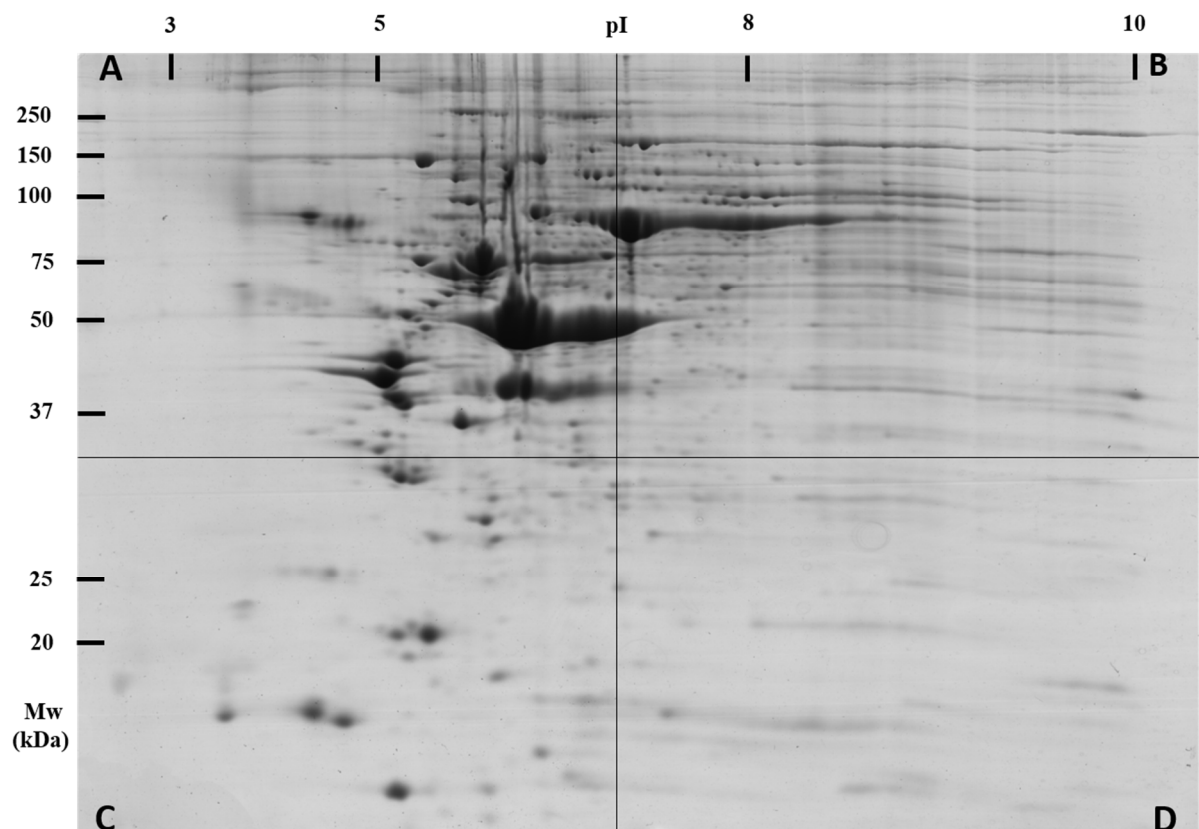
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wyniki ekspresji białek grup doświadczalnych porównano z grupą kontrolną przy użyciu testu t – Studenta, zintegrowanego z oprogramowaniem PDQuest Advanced 8.0.1. Wyniki oznaczeń wskaźników biochemicznych (cholesterol, trójglicerydy) analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Statgraphics Centurion XVI ver. 16.1.03 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA) metodą jednoczynnikowej analizy wariancji. Różnice pomiędzy zastosowanymi czynnikami dietetycznymi zostały przeanalizowane z użyciem testu post-hoc Tukeya.

5. Wyniki

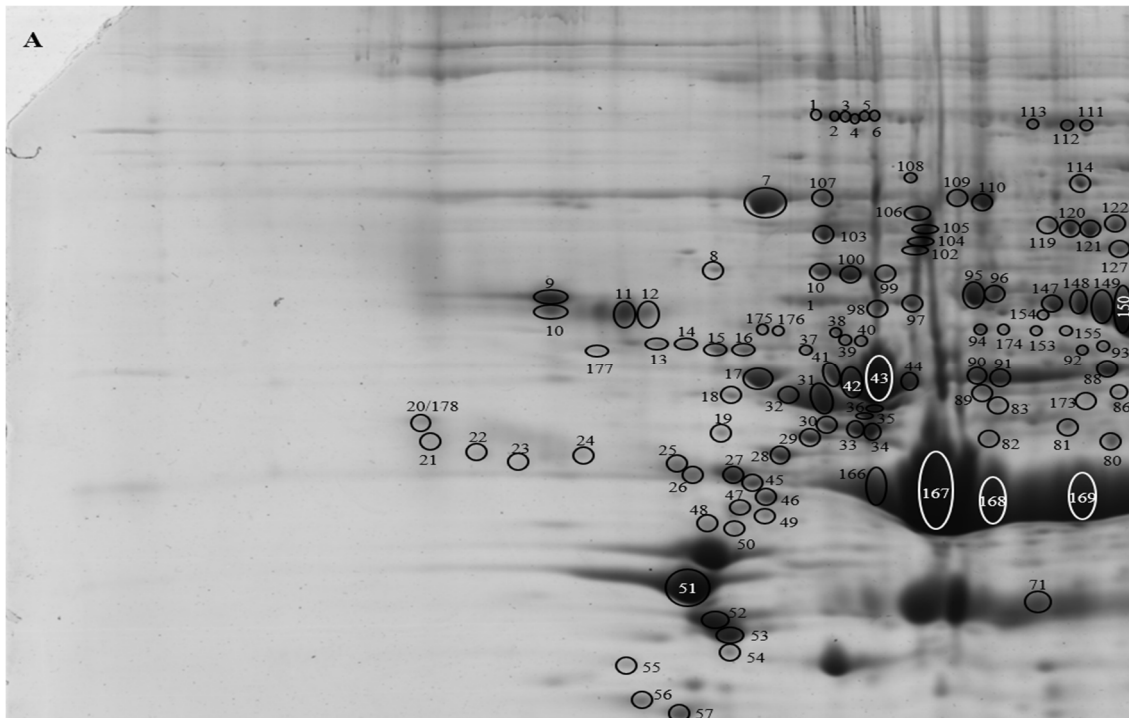
5.1. Profil białkowy aorty rosnących prosiąt

W doświadczeniu dokonano elektroforetycznego rozdzielania białek aorty 24 prosiąt, które zostały podzielone na trzy grupy doświadczalne (n=8). Żele 2-D przedstawiały profile białkowe aorty w grupie kontrolnej, grupie suplementowanej 2% dodatkiem inuliny, grupie suplementowanej 4% suszem z korzenia cykorii. W wyniku rozdzielania na żelach uzyskano 407-426 spotów białkowych, z których wycięto 333 w celu identyfikacji. Przykładowy żel reprezentujący profil białkowy aorty rosnących prosiąt zamieszczono na rys. 2.

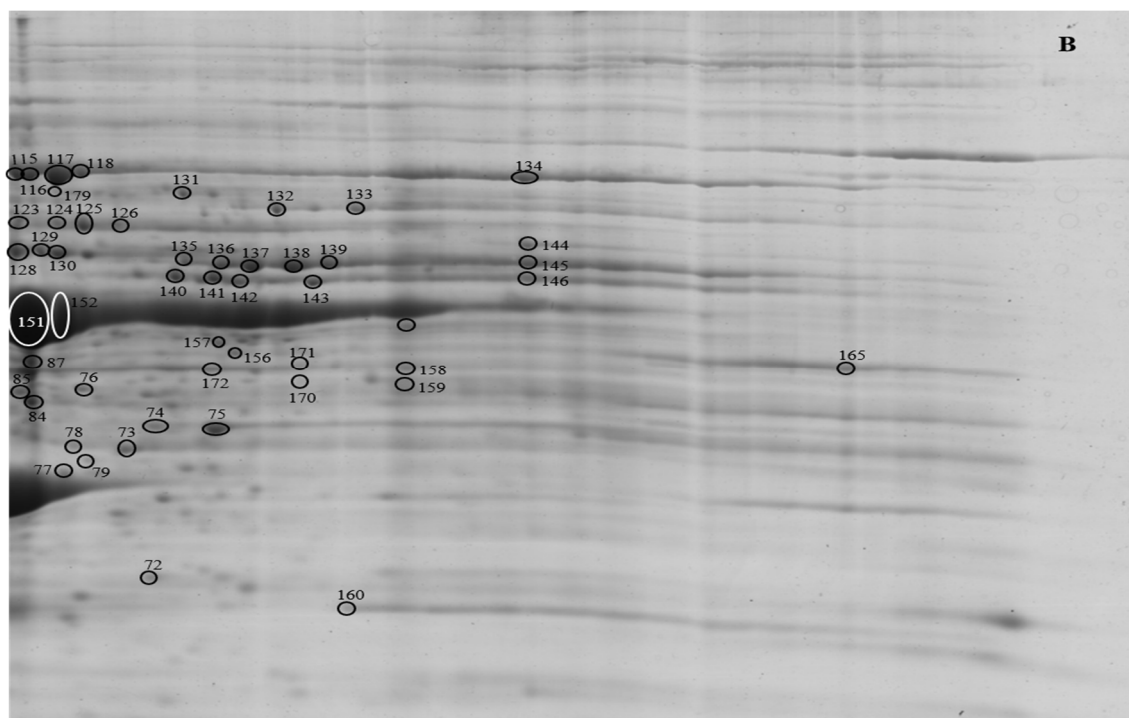
Rysunek 2. Przykładowy żel 2-D reprezentujący profil białkowy aorty rosnących prosiąt (Białka zostały rozdzielone w zakresie pH 3-10 oraz zakresie masy molekularnej 10-250 kDa). Mapa została podzielona na 4 części.



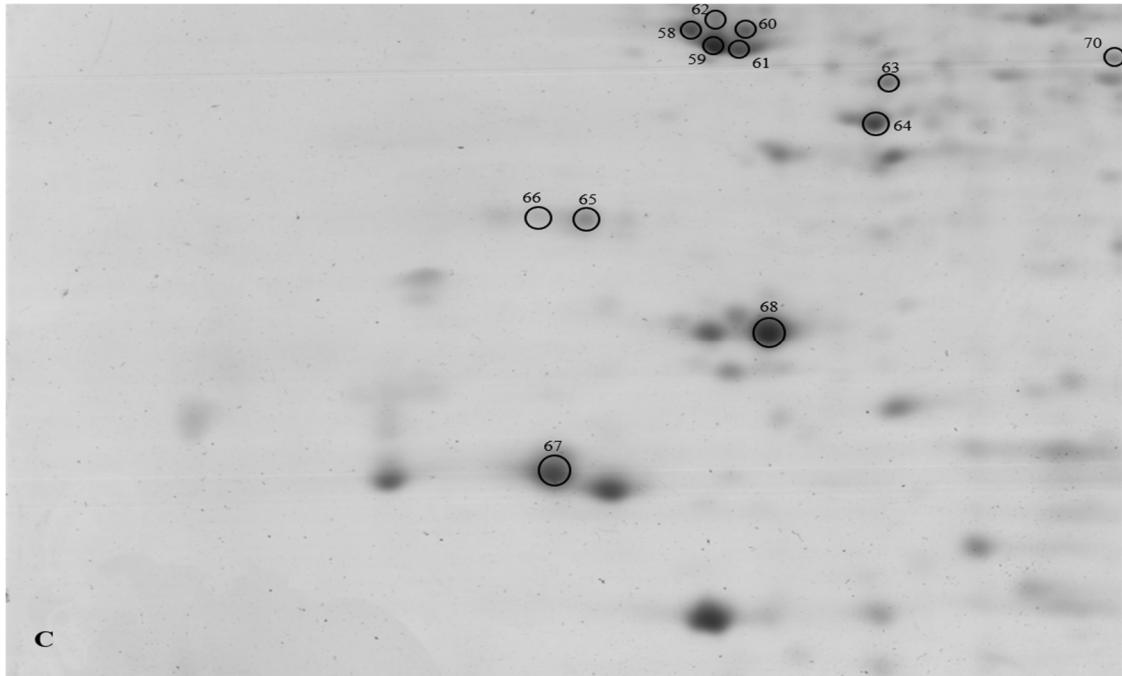
Rysunek 3. Fragment A żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.



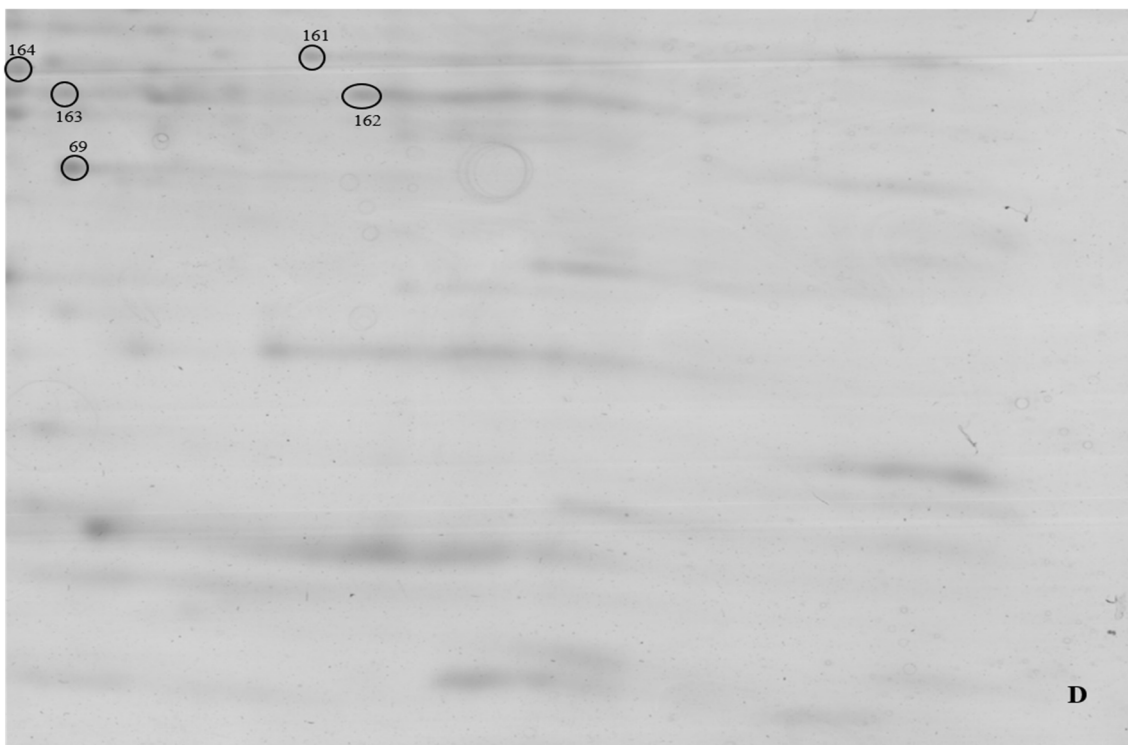
Rysunek 4. Fragment B żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.



Rysunek 5. Fragment C żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.



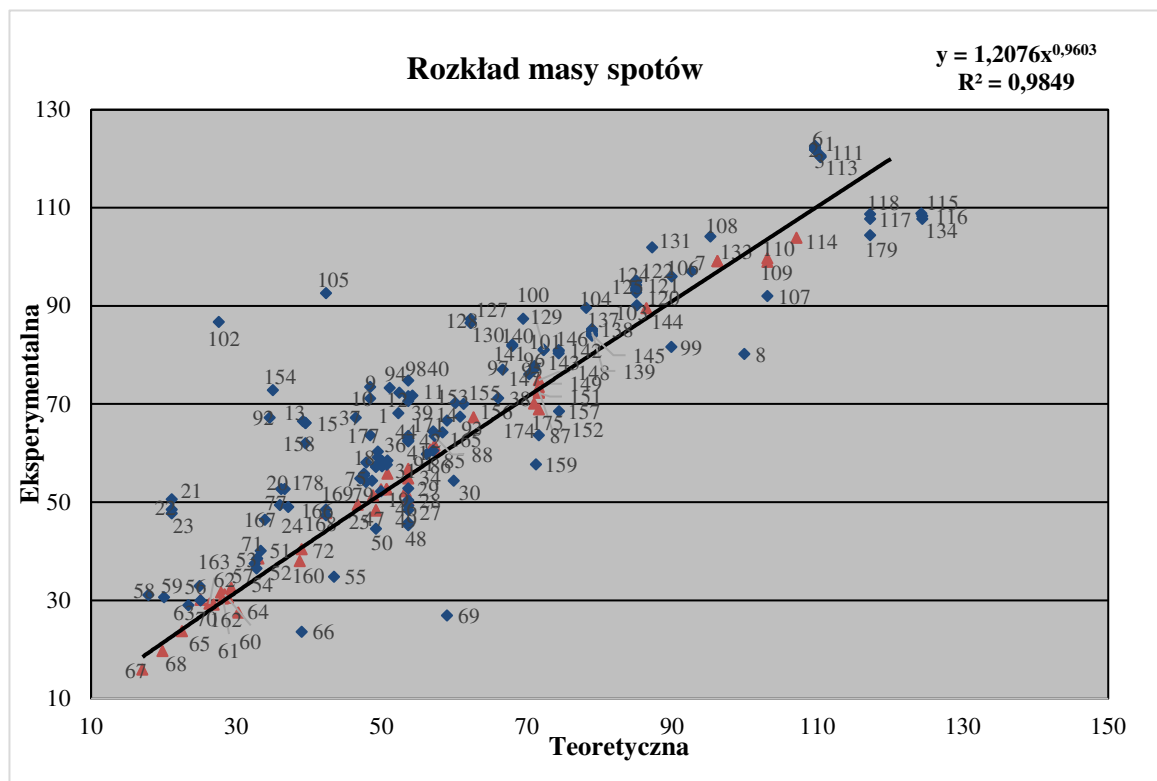
Rysunek 6. Fragment D żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.



Spośród wszystkich wyciętych spotów, które zostały poddane identyfikacji za pomocą spektrometru masowego, zidentyfikowano 179 białek (54%), które reprezentują 97 różnych produktów genowych. Wszystkie zidentyfikowane białka aorty zostały przedstawione na rys. 3-6. Informacje dotyczące zidentyfikowanych białek (numer akcesyjny, liczba SCORE, stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej, ilość dopasowanych peptydów, punkt izoelektryczny – pI oraz masa molekularna – MW), uzyskane w oparciu o bazę danych NCBI oraz SWISS-PROT, umieszczono w tabeli A. Większość białek (ok. 90%) została zidentyfikowana na podstawie wyników dla *Sus scrofa* oraz na podstawie wartości SCORE powyżej 61, a także w oparciu o procent pokrycia sekwencji aminokwasowej powyżej 20%. Weryfikacji dokonano również na podstawie liczby dopasowanych fragmentów peptydowych, która mieściła się w przedziale od 4 do 46 peptydów. Około 89% weryfikacji była oparta na co najmniej 8 dopasowanych fragmentach peptydowych.

Dla każdego zidentyfikowanego białka zostały określone wartości eksperymentalne mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych za pomocą programu PDQuest Advanced 8.0.1. Wyznaczone masy cząsteczkowe białek mieściły się w przedziale od 15,9 do 122,6 kDa, a ponad 94% białek charakteryzowało się masą cząsteczkową powyżej 30 kDa, natomiast wartości punktów izoelektrycznych mieściły się w zakresie od 4,2 do 9. Eksperymentalne masy molekularne i punkty izoelektryczne porównano z wartościami dostępnymi w bazach danych NCBI i SwissProt (tabela A). Rysunki 7 i 8 przedstawiają wartości eksperymentalne i teoretyczne mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych. W przypadku mas cząsteczkowych (MW) zaobserwowano, że dla 7 białek porównywane wartości są istotnie odstające, natomiast w przypadku punktów izoelektrycznych (pI) dla 17 białek uznano za istotnie odstające. Dla pozostałych białek wartości eksperymentalne i teoretyczne MW/pI wykazywały jedynie niewielkie odchylenia. W tabeli A zostały umieszczone informacje dotyczące zidentyfikowanych białek, informacje dotyczące rozdziału elektroforetycznego (2DE) oraz dane uzyskane w oparciu o bioinformatyczne bazy danych (NCBI, SwissProt). Numery zidentyfikowanych spotów białkowych odpowiadają numerom na rys. 7 i 8.

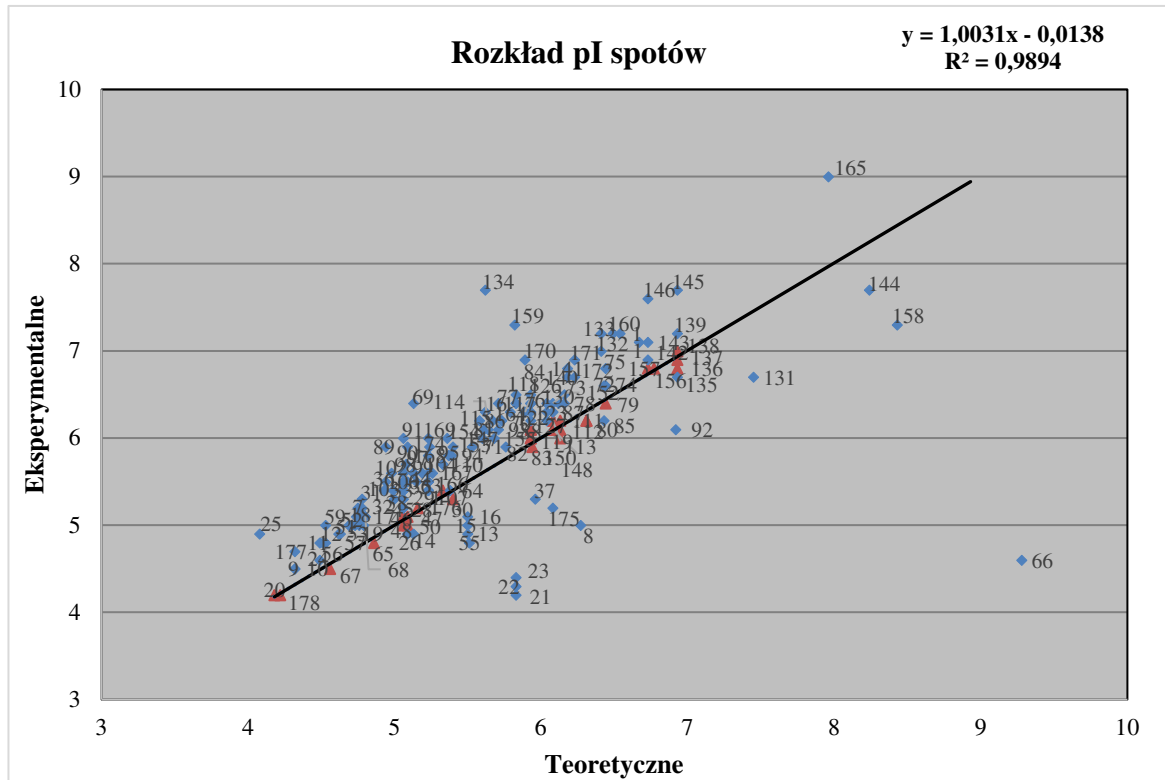
Rysunek 7. Zestawienie porównawcze eksperymentalnych i teoretycznych mas molekularnych białek zidentyfikowanych w aorcie rosnących prosiąt.



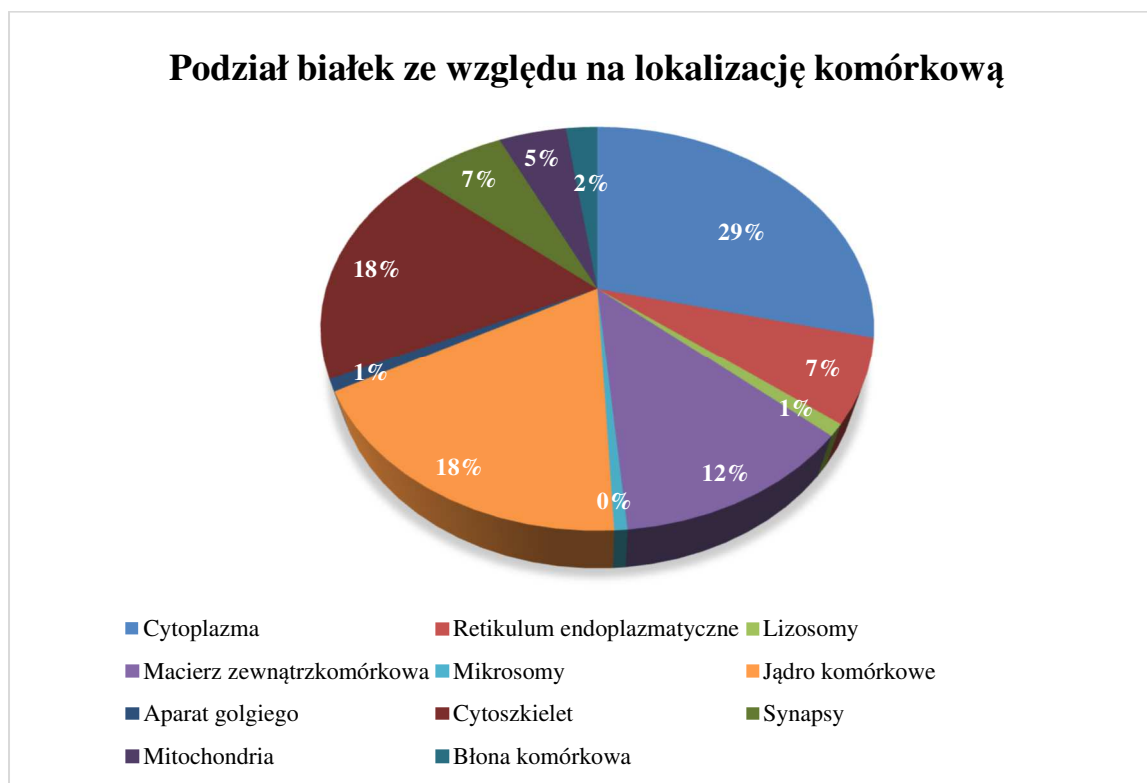
Spośród wszystkich zidentyfikowanych białek 31 występowało w więcej niż jednym spotcie, co może świadczyć o występowaniu i osobnym rozdziale izoform tych białek, które minimalnie różnią się wartościami mas molekularnych oraz punktów izoelektrycznych. 18 białek zostało zidentyfikowanych w dwóch spotach np.: białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3 (spot nr 171, 172), białko szoku cieplnego o masie 71 kDa (spot nr 73, 78), izoforma 1 alfa enolazy (spot nr 74, 75), izoforma 1 czynnika elongacyjnego 2 (spot nr 132, 133), kalretikulina (spotnr 9, 10), peroksyredoksyna (spot nr 70, 164), winkulina (spot nr 116, 134), izoforma 2 białka o masie 78 kDa regulowanego poziomem glukozy (100, 101), izoforma 1 fibuliny 5 (spot nr 11,12). Pozostałe białka występowały w trzech spotach jak np.: kwaśna alfa-1 glikoproteina (nr spotów 21-23), alfa aktynina 1 (spot nr 107, 109, 110), alfa-2HS-glikoproteina (spot nr 13, 15, 16), łańcuch alfa kolagenu-2 typ VI (spot nr 111-113), izoforma 3 winkuliny (117, 118, 179). Natomiast alfa aktynina mięśnia szkieletowego (spot nr 105, 166, 168, 169) i prelamina A/C (spot nr 142, 143, 146, 157) występowały w 4 spotach, pozostałe białka zaobserwowano w 5 spotach (izoforma 2 wimentyny, spot nr 26, 35, 47, 50, 90), łańcuch alfa kolagenu 1 typ VI (spot nr 1-6) i serotransferyna (spot nr 135-139, 145) występowały

w 6 spotach, izoformę 1 wimentyny obserwowano w 7 spotach białkowych. Najliczniej występującymi białkami były albumina surowicza (spot nr 87, 148-152, 159, 175), gelsolina (119-126) oraz wimentyna występująca w 9 spotach (spot nr 34,39, 42, 44-46, 48, 49, 98).

Rysunek 8. Zestawienie porównawcze eksperymentalnych i teoretycznych wartości punktów izoelektrycznych białek zidentyfikowanych w aorcie rosnących prosiąt.



Rysunek 9. Lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych białek aorty prosiąt na podstawie analizy bioinformatycznej z zastosowaniem programu Euk-mPlock 2.0.

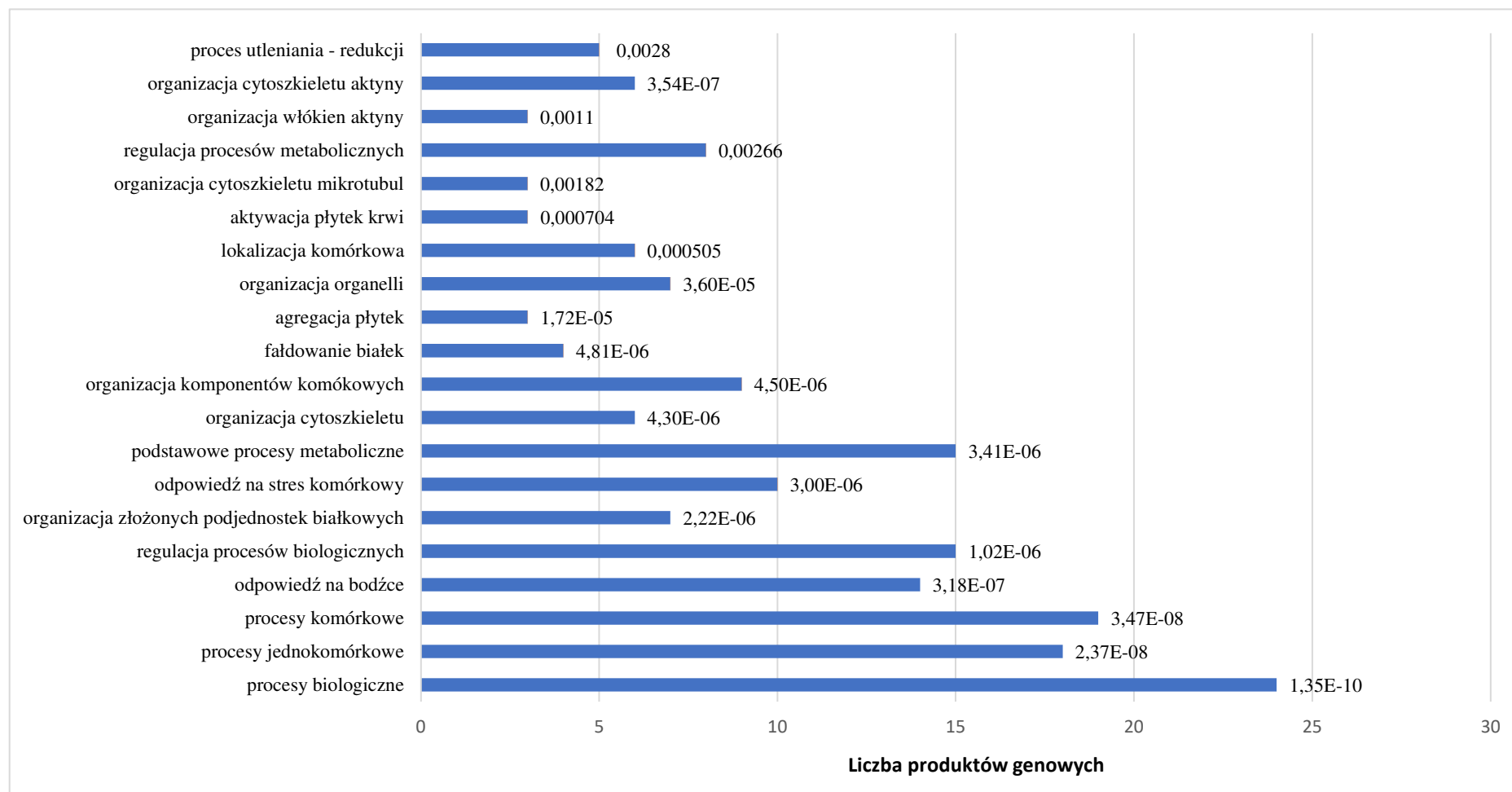


Zidentyfikowane białka zostały podzielone ze względu na lokalizację komórkową, z wykorzystaniem programu bioinformatycznego Euk-mPlock 2.0. Analiza programem wykazała, że największą grupę stanowią białka cytoplazmatyczne (29%), cytoszkieletarne (18%) oraz białka występujące w jądrze komórkowym (18%). Pozostałe białka zlokalizowane są w macierzy zewnątrzkomórkowej (12%), synapsach (7%), retikulum endoplazmatycznym (7%) oraz mitochondriach (5%). Najmniejszą grupę białek stanowiły białka zlokalizowane w błonie komórkowej (2%), lizosomach (1%) i aparacie Golgiego (1%).

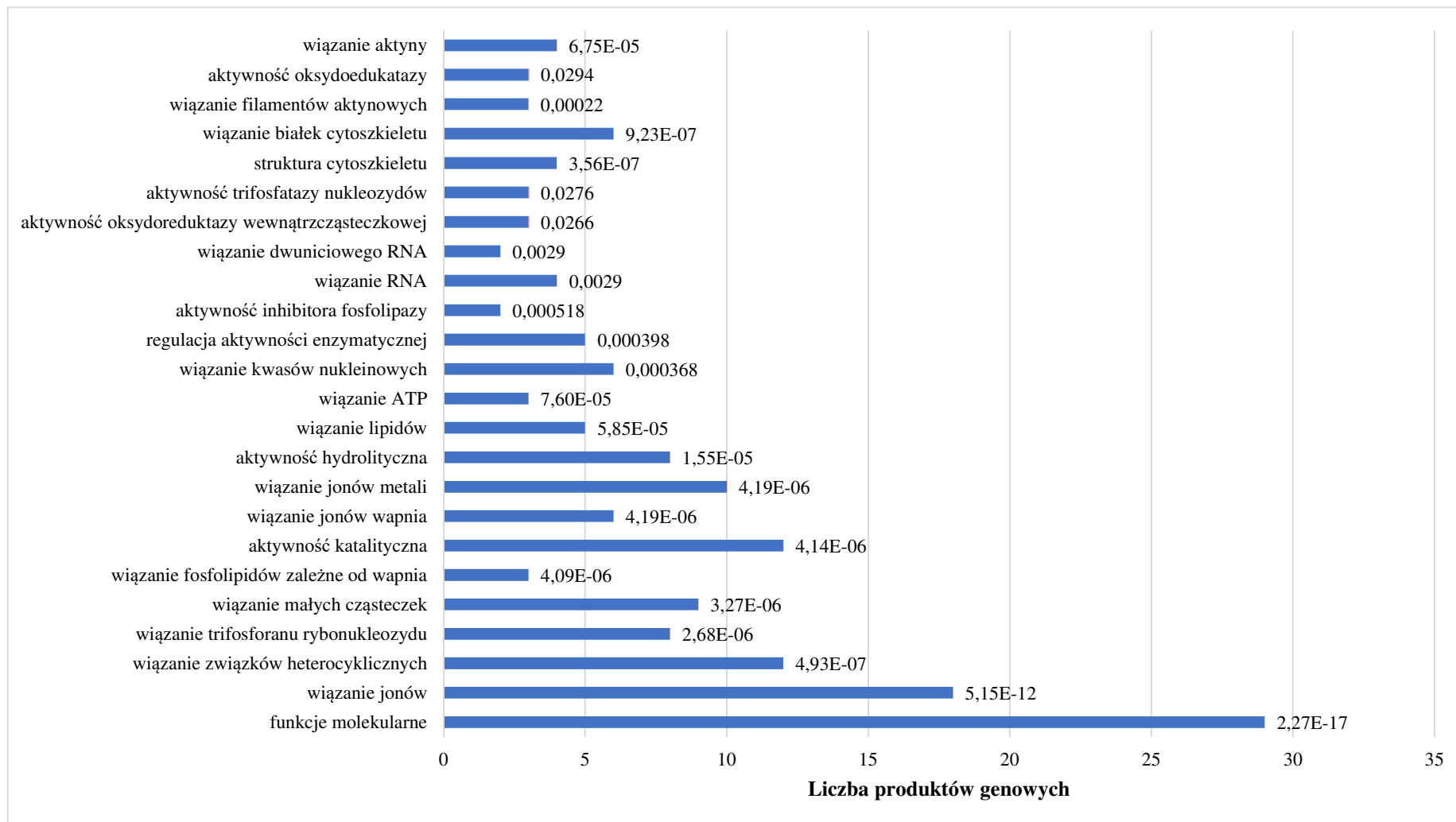
Za pomocą programu String v.10 (<https://string-db.org>) sklasyfikowano białka na podstawie udziału w procesach biologicznych (rys. 10) i funkcji molekularnych (rys. 11). W procesy biologiczne zaangażowanych było 24 białka ($p=1.35e-10$), a w szczególności udział w procesach komórkowych ($n=19, p=3.46e-08$), regulacji procesów biologicznych ($n=15, p=2.22e-06$) i metabolicznych ($n=15, p=3.41e-06$) oraz odpowiedzi na stres komórkowy ($n=10, p=3.00e-06$). Ponadto część białek jest zaangażowana w organizację cytoszkieletu ($n=6, p=4.30e-06$) oraz agregację ($n=3, p=1.72e-05$) i aktywację płytek

($n=3$, $p=0,000704$). W przypadku funkcji molekularnych 29 białek bierze udział w wiązaniu jonów ($n=18$, $p=5.15e-12$), wiązaniu związków heterocyklicznych ($n=12$, $p=4.93e-07$), aktywności katalitycznej ($n=12$, $p=4.4e-06$), wiązaniu jonów metali ($n=10$, $p=4.19e-06$). Ponadto analiza szlaków metabolicznych (rys. 12) wykazała, że najwięcej białek zaangażowanych jest w ścieżkę sygnałową kinazy fosfatidyloinozytolu 3 ($n=10$, $p=1.54e-05$), procesy przetwarzania białek w retikulum endoplazmatycznym ($n=9$, $p=1.42e-06$)

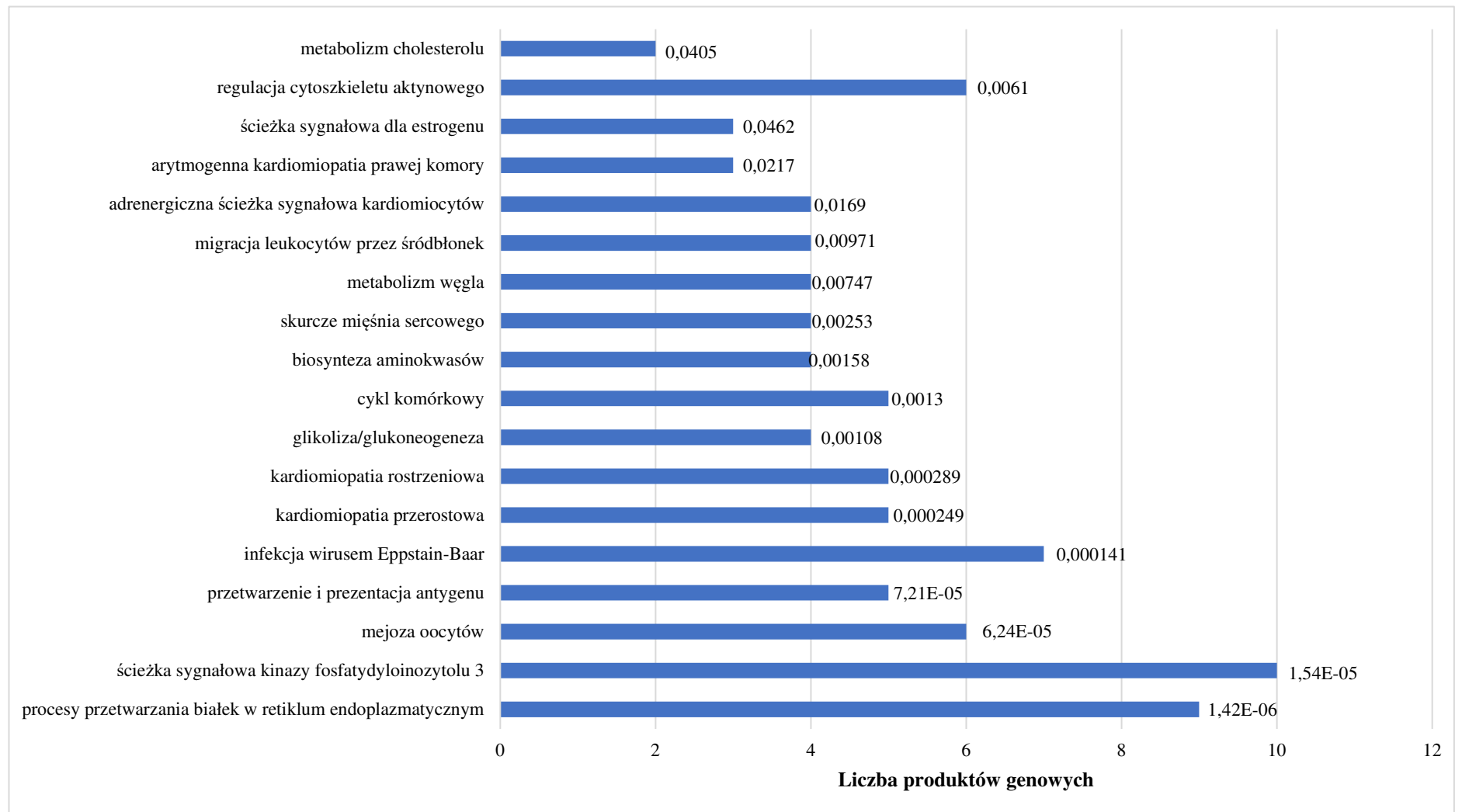
Rysunek 10. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty wg uczestnictwa w procesach biologicznych z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.



Rysunek 11. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty ze względu na pełnioną funkcję molekularną z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.



Rysunek 12. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty wg uczestnictwa w szlakach metabolicznych z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.



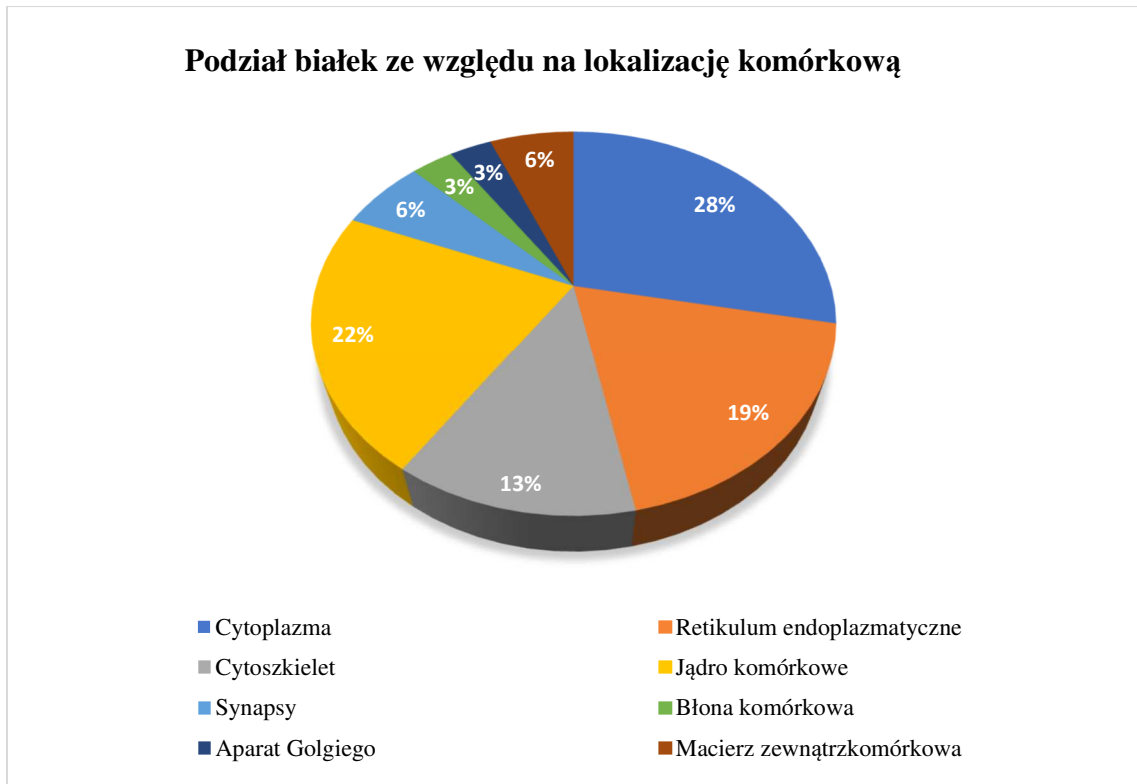
5.2. Analiza zmian ekspresji białek aorty rosnących prosiąt

Wszystkie spoty białkowe otrzymane na żelach poliakrylamidowych zostały poddane analizie za pomocą programu bioinformatycznego PDQuest Advanced 8.0.1, mającego na celu określenie istotności różnic ekspresji białek między grupą kontrolną, a grupami doświadczalnymi. Ponadto dla wszystkich grup została oznaczona wartość współczynnika zmienności (CV), gdzie dla grupy kontrolnej wyniosła 62,17, dla grupy suplementowanej 2% dodatkiem wodnego roztworu inuliny CV wynosił 61,28 oraz 65,85 dla grupy, która otrzymywała 4% dodatek suszu z korzenia cykorii.

W wyniku analizy bioinformatycznej żeli 2-D aorty prosiąt, stwierdzono 23 białka różniące się ekspresją pomiędzy grupą kontrolną, a grupą suplementowaną 2% dodatkiem wodnego roztworu inuliny na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Za pomocą spektrometru masowego typu MALDI-TOF zidentyfikowano 13 białek spośród, których 11 było regulowanych w dół, a pozostałe 2 białka wykazywały wzrost ekspresji. W przypadku grupy, która otrzymywała 4% dodatek suszu z korzenia cykorii analiza wykazała zmianę ekspresji 31 białek na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Wśród nich zidentyfikowano 18 białek, spośród których 16 obniżyło swoją ekspresję, natomiast 2 białka wykazywały zwiększoną ekspresję.

Rysunek 13 przedstawia białka, które zostały podzielone na podstawie lokalizacji komórkowej za pomocą programu Euk-mPlock 2.0. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że najliczniejszą grupę białek stanowiły białka cytoplazmatyczne (28%), białka wchodzące w skład jądra komórkowego (22%), białka retikulum endoplazmatycznego (29%) Pozostałe białka wchodzą w skład cytoszkieletu (13%), macierzy zewnątrzkomórkowej (6%) synaps (6%), natomiast po 3% stanowią białka zlokalizowane błonie komórkowej oraz aparacie Golgiego.

Rysunek 13. Lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych białek aorty prosiąt, które charakteryzują się zmienioną ekspresją na podstawie analizy bioinformatycznej z zastosowaniem programu Euk-mPlock 2.0.



Ponad 74% białek została zidentyfikowana na podstawie wyników dla *Sus scrofa* oraz na podstawie wartości score większej niż 61, a także w oparciu o procent pokrycia sekwencji powyżej 20%.

TABELA 3 Lista białek aorty rosnących prosiąt wykazujących różnice w ekspresji pod wpływem suplementacji diety inuliną i/lub suszem z korzenia cykorii. Numery spotów odpowiadają numerom na mapie z rys. 3-6. Dla każdego białka, na podstawie bazy danych (UniProt/NCBI), podano jego nazwę, nazwę genu, stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej oraz teoretyczną masę (MW) i punkt izoelektryczny (pI). W tabeli zawarto również wartości eksperymentalne MW i pI. Kolumny gr D1/K i gr D2/K- porównanie ekspresji wskazanych białek w grupie D1 (2% dodatku wodnego wyciągu inuliny) i grupie D2 (4% dodatku suszu z korzenia cykorii) w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości <1 oznaczają obniżenie ekspresji (kolor zielony) natomiast wartości >1 wskazują na wzrost ekspresji (kolor czerwony) danego białka. Wyniki istotne statystycznie, na poziomie $p \leq 0,05$ zostały wytłuszczone.

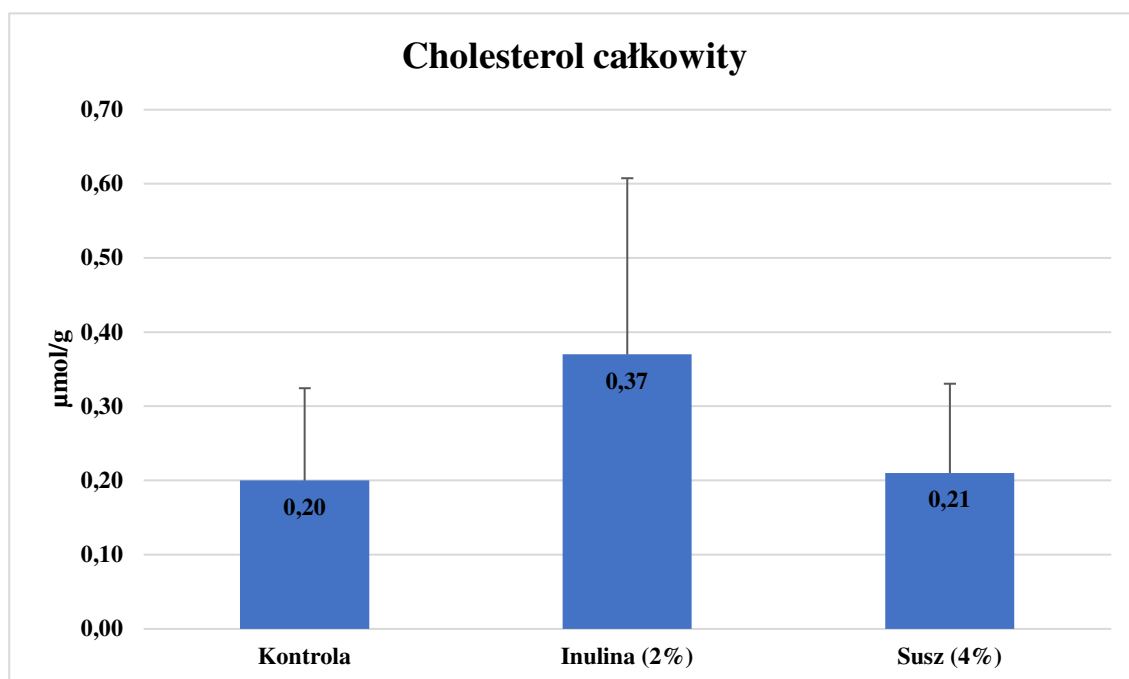
Nr spotu	Numer akcesyjny	Nazwa białka	Nazwa genu	Krotność zmian		Stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej (%) / MASCOT	Teoretyczne pI/MW (pH/kDa)	Eksperymentalne pI/MW (pH/kDa)
				D1/K	D2/K			
REGULACJA CIŚNIENIA KRWI								
20	XP_020953684	Izoforma 3 retikulokalbiny 2	RCN2	0.61	0.52	35/87	4.18/36.21	4.2/52.7
22	AAA30983	Kwaśna alfa-1 glikoproteina (częściowa)	ORM1	0.35	0.36	36/81	5.83/21.11	4.3/48.5
23	AAA30983	Kwaśna alfa-1 glikoproteina (częściowa)	ORM1	0.45	0.50	36/94	5.83/21.11	4.4/47.7
CHAPERONY/ODPOWIEDŹ NA STRES								
177	NP_001167604	Prekursor kalretikuliny	CALR	0.51	0.71	29/83	4.32/48.43	4.7/63.6
93	NP_001230356	Podjednostka alfa białka 1 kompleksu T	TCP1	0.45	0.52	28/98	5.71/60.83	6.1/67.4
174	P19378	Białko szoku cieplnego A8	HSPA8	0.70	0.70	25/71	5.24/70.99	5.9/70.1
76	NP_001182041	Prekursor białkowej izomerazy dwusiarczkowej A3	PDIA3	0.70	0.63	34/108	5.93/57.28	6.4/61.6
171	Q4VIT4	Białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3	PDIA3	0.55	0.48	23/64	6.23/57.14	6.9/64.4
172	Q4VIT4	Białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3	PDIA3	1.29	1.71	20/62	6.23/57.14	6.7/60.5
CYTOSZKIELET/SYGNALIZACJA KOMÓRKOWA/PRZYCZEPY OGNISKOWE								
39	P02543	Wimentyna	VIM	0.93	0.57	28/89	5.06/53.69	5.4/70.6
98	P02543	Wimentyna	VIM	0.30	1.30	28/62	5.06/53.69	5.6/74.8
179	XP_005671131	Izoforma 3 winkuliny	VCL	0.65	0.72	31/121	5.83/117.25	6.4/104.4

81	NP_001127815	Białko 3 związane z aktyną	ACTR3	0.52	0.67	35/85	5.61/47.85	6.1/54.1
143	Q3ZD69	Prelamina A/C	LMNA	0.64	0.78	56/333	6.73/74.40	7.1/80.3
86	ANH21174	Septyna 8	SEPT8	0.63	0.57	35/100	5.67/56.22	6.2/59.8
160	P19620	Aneksyna A2	ANXA2	1.86	1.27	57/200	6.49/38.76	7.2/38.0
55	Q6NZI2	Białko 1 związane z kaweolami	CAVIN1	0.60	0.57	17/62	5.51/43.45	4.8/34.8
MACIERZ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA								
1	XP_020926753	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	2.04	1.34	12/79	5.23/109.69	5.4/122.2
2	XP_020926753	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	0.73	0.59	25/178	5.23/109.69	5.4/121.8
	3							
113	XP_020938158	Łańcuch alfa kolagenu – 2 (VI)	COL6A2	0.46	1.06	24/123	6.13/110.44	6.0/120.6
176	XP_013851600	Białko macierzy zewnątrzkomórkowej zawierającej EGF, podobne do fibuliny 1	EFEMP1	0.58	0.34	29/81	5.16/52.30	5.2/68.1
INNE								
74	XP_020950937	Izoforma 1 alfa enolazy	ENO1	1.05	0.71	36/87	6.44/47.60	6.6/55.8
170	P31943	Heterogenna jądrowa rybonukleoproteina H	HNRNPH1	0.39	0.59	27/66	5.89/49.48	6.9/60.3
173	Q6Q7J2	Inhibitor beta dysocjacji GDP specyficzny dla białek Rho	GDI2	0.54	0.49	37/84	6.31/50.75	6.2/57.6
175	P08835	Albumina surowicza	ALB	1.32	0.60	25/72	6.08/71.64	5.2/68.9

5.3. Wskaźniki biochemiczne aorty

W doświadczeniu oznaczono koncentrację wybranych wskaźników biochemicznych aorty (cholesterol całkowity, trójglicerydy) w grupie kontrolnej, grupie suplementowanej 2% wodnym roztworem inuliny i grupie, która otrzymywała 4% dodatek suszu z korzenia cykorii.

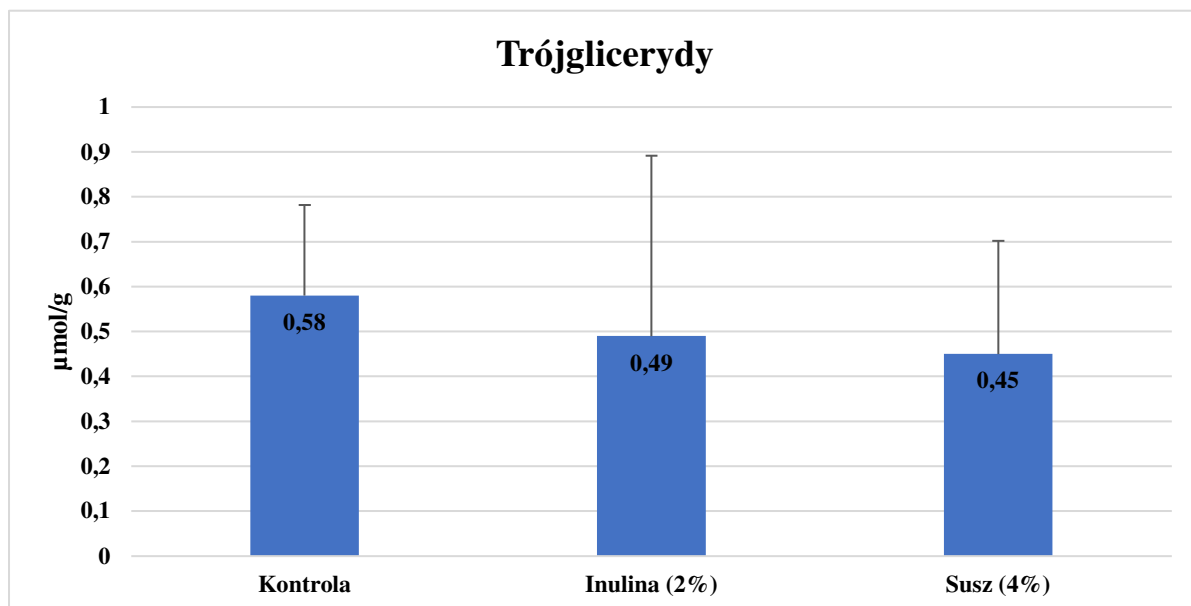
Rysunek 14. Średnie stężenie cholesterolu w aorcie prosiąt w trzech grupach żywieniowych. Na rysunku oznaczono średnie wartości oraz odchylenie standardowe w każdej z grup żywieniowych.



Koncentracja cholesterolu całkowitego w aorcie prosiąt mieściła się w zakresie od 0,20-0,37 μmol/g. Największe stężenie cholesterolu w aorcie stwierdzono po podaniu diety z dodatkiem 2% wodnego wyciągu inuliny. Natomiast po podaniu 4% suszu z korzenia cykorii stężenie cholesterolu w tej grupie było zbliżone z wartością w grupie kontrolnej.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic średniego stężenia cholesterolu w aorcie prosiąt pomiędzy grupami doświadczalnymi.

Rysunek 15. Średnie stężenie trójglicerydów w aorcie prosiąt w trzech grupach żywieniowych. Na rysunku oznaczono średnie wartości oraz odchylenie standardowe w każdej z grup żywieniowych.



Stężenie trójglicerydów w aorcie prosiąt wahało się w zakresie od 0,58 μmol/g (w grupie kontrolnej) do 0,45 μmol/g w grupie doświadczalnej, która otrzymywała dodatek 4% suszu z korzenia cykorii.

Obserwowane różnice obniżania się stężenia trójglicerydów w aorcie prosiąt po podaniu diet eksperymentalnych nie uzyskały jednak potwierdzenia statystycznego.

6. Dyskusja

W prezentowanej rozprawie doktorskiej podjęto próbę, wyjaśnienia wpływu diety wzbogaconej wodnym ekstraktem z inuliny oraz suszem z korzenia cykorii, na zmiany profilu białkowego aorty u rosnących prosiąt. Wykorzystanie narzędzi proteomicznych takich jak: elektroforeza dwukierunkowa i spektrometria mas pozwoliło na scharakteryzowanie proteomu aorty oraz wskazanie różnic w profilach białkowych, spowodowanych działaniem diety inulinowej na badane tkanki. Dodatkowo wymiernym i bardzo istotnym efektem prezentowanej pracy było uzyskanie powtarzalnych map białkowych aorty rosnących prosiąt, a także charakterystyka zidentyfikowanych białek.

Istotnym znaczeniem w badaniach proteomicznych poszczególnych tkanek, narządów oraz płynów ustrojowych są analizy związane ze stworzeniem w pierwszej kolejności kompletnej i powtarzalnej mapy reprezentującej charakterystyczny wzór białek. Powtarzalna mapa białkowa stanowi bardzo istotne odniesienie w badaniach skierowanych na charakterystykę zmian w profilach białkowych pod wpływem zmiennych warunków fizjologicznych czy wybranego czynnika doświadczalnego (w przypadku prezentowanych badań – wpływ diety).

Znajomość składu białkowego tkanek u świń może pozwolić uzupełnić informację dotyczące różnic i podobieństw funkcjonowania mechanizmów na poziomie molekularnym. Istotnym ograniczeniem badań proteomicznych u tego gatunku zwierząt gospodarskich jest nadal jeszcze niekompletna baza związania z masą peptydów poszczególnych białek. Utrudnia to poszukiwanie w bazach danych rzeczywistej sekwencji białka świńskiego, a homologiczne sekwencje białek innych gatunków zwierząt, które nie są wystarczająco identyczne nie zawsze przynoszą odpowiednio wysoki rezultat właściwego ich dopasowania.

Dlatego prezentowane wyniki mogą być uzupełnieniem dostępnych obecnie profili białkowych u młodych rosnących prosiąt na żelach po elektroforezie dwukierunkowej i odniesieniem do monitorowania zmian w odpowiedzi na czynniki fizjologiczne i patologiczne. Analiza piśmiennictwa wskazuje na brak doniesień związanych z aortą młodych rosnących zwierząt.

Jedne z pierwszych badań związanych z utworzeniem map białkowych wybranych tkanek i płynów ustrojowych u zwierząt gospodarskich przeprowadził D'Ambrosio i wsp. (2005). Wykorzystując elektroforezę dwukierunkową i spektrometrię

masową autorzy scharakteryzowali mapy białkowe nerek, wątroby, mięśni poprzecznie prążkowanych osocza oraz erytrocytów u bydła.

Pierwszej analizy proteomicznej tkanek u *Sus scrofa* dokonali Lametsch i Bendixen (2001) z wykorzystaniem elektroforezy 2D oraz spektrometrii mas. Autorzy na żelu 2D otrzymali 1000 pojedynczych spotów białkowych z mięśni pobranych bezpośrednio po uboju oraz 4,8,24,48 godzin po śmierci. Następnie dokonali identyfikacji białek i ich zmian ekspresji w mięśni najdłuższym grzbiecie *post mortem* w trakcie przechowywania tuszy. Analiza zmian w poszczególnych godzinach przechowywania wykazała zmianę ekspresji 15 białek jako konsekwencję *post mortem*. Wśród tych białek zidentyfikowano m.in. aktynę, troponinę T, miozynę, fosforylaze glikogenu, kinazę keratynową oraz miokinazę. Według autorów zmiana ekspresji białek związana była z ich zaangażowaniem w pośmiertną konwersję mięśni do mięsa. Ponadto wskazali te białka jako istotne markery jakości mięsa.

Analiza piśmiennictwa wskazuje na wciąż niewielką ilość doniesień związanych z badaniem profili białkowych tkanek oraz płynów ustrojowych u świni. Brakuje również doniesień związanych z identyfikacją kompletnej mapy proteomu aorty u rosnących zwierząt.

W prezentowanym doświadczeniu uzyskano 407-426 spotów białkowych tkanki aortalnej w grupie kontrolnej (przed podaniem inuliny). Spośród wszystkich 333 wyciętych spotów białkowych z żelu 2D, zidentyfikowano 179 białek reprezentujących profil białkowy tkanki aorty *Sus scrofa*. Wszystkie zidentyfikowane białka reprezentują 97 odrębnych produktów genowych.

W prezentowanej pracy większość zidentyfikowanych białek wchodzi w skład cytoplazmy, cytoszkieletu, jądra komórkowego oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Na podstawie informacji uzyskanych za pomocą programu bioinformatycznego STRING v10 stwierdzono, że zidentyfikowane białka pod względem procesów biologicznych biorą udział m. in. w procesach komórkowych, organizacji cytoszkieletu, odpowiedzi na stres komórkowy, a także aktywacji oraz agregacji płytek. Również część tych białek pod względem funkcji molekularnych zaangażowanych jest m.in. w wiązanie jonów, organizację białek i struktury cytoszkieletu. Ponadto z analizy bioinformatycznej wynika, że zidentyfikowane białka pod względem uczestnictwa w szlakach metabolicznych biorą udział m.in. w procesach przetwarzania białek w retikulum endoplazmatycznym oraz w regulacji cytoszkieletu aktynowego.

Na ilość zidentyfikowanych białek może mieć wpływ ilość białka w badanych próbach oraz ograniczenia wynikające z zastosowania metody „odcisku palca” (Kamińska i Podbielska, 2011). W przeprowadzonym doświadczeniu ilość białek zawarta w próbce wynosiła 1100µg. Była to ilość graniczna możliwa do zastosowania właściwego rozdziału elektroforetycznego oraz wystarczająca do detekcji i identyfikacji z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI-TOF. Należy zwrócić uwagę, że na brak całkowitej identyfikacji mapy aorty może wpływać ilość proliny oraz hydroksyproliny we włóknach sprężystych takich jak kolagen i elastyna, które odpowiadają za właściwości sprężyste aorty. Enzymem używanym do trawienia białek jest tripsyna, która hydrolizuje wiązania peptydowe od C-terminalnej strony argininy (Arg) lub lizyny (Lys), natomiast w przypadku gdy po reszcie Arg lub Lys występuje prolina wówczas wiązanie takie jest odporne na działanie tego enzymu (Dubin i Władyka, 2003). Ponadto niska masa cząsteczkowa peptydów (poniżej 700 Da) oraz brak dostępnych w bazach danych sekwencji aminokwasowych również mogą wpływać na niską jakość spektrum masowego, stanowiącą mapę peptydową danego białka. Wybrane do badań metody badawcze, a także trudna do analizy tkanka niosą ze sobą pewne ograniczenia. Dlatego też wielokrotne analizy tej tkanki z zastosowaniem różnych metod rozdziału białek i ich identyfikacji pozwalają na uzyskanie pełniejszego profilu białkowego aorty, które uzupełnią zasoby istniejących baz danych.

W doświadczeniu dokonano mapowania aorty oraz zestawienia wartości eksperymentalnych mas cząsteczkowych oraz punktów izoelektrycznych zidentyfikowanych białek. Otrzymane wartości wykazywały niewielkie odchylenia od wartości teoretycznych znajdujących się w bazach danych. Jedynie w przypadku 24 białek, zaobserwowano że wartości eksperymentalne punktów izoelektrycznych (17 białek) oraz mas molekularnych (7 białek), zostały uznane za istotnie odstające. Prawdopodobnie przyczyną występowania różnic między wartościami eksperymentalnymi a teoretycznymi MW i/lub pI mogą być różnego rodzaju modyfikacje potranslacyjne (acetylacja, glikozylacja, fosforylacja), proteoliza białek, obecność lub brak peptydów sygnałowych (Rogowska-Wrzesińska i wsp., 2013). Jak podaje Miller i wsp. (2009) białka, które są zidentyfikowane na podstawie sekwencji aminokwasowych innych gatunków, przyczyniają się również do wykazywania różnic w wartościach MW i pI, ponieważ właściwości fizykochemiczne są różne dla białek w zależności od gatunku.

W prezentowanym doświadczeniu zaobserwowano, że spośród wszystkich zidentyfikowanych białek mapy aorty 31 występowało w więcej niż jednym spocie

białkowym na żelu. Prawdopodobnie jest to spowodowane występowaniem izoform tych białek, a także ich osobny rozdział elektroforetyczny, ponieważ mogą wykazywać minimalne różnice w masie molekularnej oraz punkcie izoelektrycznym (Bouley i wsp., 2004).

Charakterystyka oraz analiza proteomu aorty u świni ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia biologii naczyniowej. Aorta, która składa się z tkanki łącznej, a także włókien elastycznych jest trudnym materiałem do badań proteomicznych. Nierozpuszczalność tkanki łącznej utrudnia ekstrakcję białek z aorty (Fu i wsp., 2013). Wykorzystanie odpowiednich strategii proteomicznych jak np. elektroforeza 2D połączona ze spektrometrią mas pozwoliły na przezwycięzenie tych trudności metodycznych (poza wyżej wskazanymi ograniczeniami związanymi z detekcją/identyfikacją białek).

Zanim dokonano pierwszych prób mapowania naczyń krwionośnych u świń, jedną z pierwszych analiz związanych z ustaleniem proteomu komórek mięśni gładkich aorty przeprowadzono u człowieka i myszy. Song i wsp. (1985) dokonali porównania młodych oraz starszych ludzkich tkanek aorty z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej i spektrometrii mas. Autorzy zaobserwowali 17 białek, które uległy wysokiej ekspresji w przypadku starszych tkanek aorty. Mayr i wsp. (2005) scharakteryzowali proteom komórek progenitorowych SCA-1, które mogą funkcjonować jako prekursorzy komórek mięśni gładkich naczyń. Autorzy stosując elektroforezę dwukierunkową oraz spektrometrię mas typu MALDI-TOF MS/MS zwizualizowali 2400 białek, spośród których zidentyfikowali 235. Była to jedna z pierwszych i najobszerniejszych analiz profilu białkowego aorty. Uzyskana powtarzalna mapa białkowa stanowiła bardzo ważne odniesienie do kolejnych badań związanych ze zmianami i identyfikacją różnic w profilach białkowych w różnych warunkach fizjologicznych u genetycznie modyfikowanych myszy oraz badaniu patologii naczyniowej. Fu i wsp. (2013) przeprowadzili badania w których porównano ekstrakty białkowe aorty z młodych (8 miesięcy) i starych (30 miesięcy) szczurów krzyżowych Fisher 334. W badaniach tych wykazano że 50% białek wykazuje istotną różnicę pomiędzy dwoma grupami doświadczalnymi. Wiele z tych białek to białka naczyniowej przestrzeni pozakomórkowej. Autorzy sugerują, że to właśnie białka przestrzeni pozakomórkowej odzwierciedlają efekty starzenia się aorty niż inne części tej tkanki. Bardzo interesującym jest fakt, że 26 białek (z 50%) jest bezpośrednio związanych z kaskadą sygnalizacyjną angiotensyny II. Autorzy w badaniach stwierdzili obecność

typowych białek sekrecyjnych w tym proteazy serynowej HTRA1 (HTRA1), cysteiny i bogatego w glicynę białka 2 (CSRP2), czynnika wzrostu płytek 4 (PF4), białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 7 (IGFBP-7) oraz klasterynę (CLU). W prezentowanej pracy nie stwierdzono obecności tych białek w aorcie rosnących prosiąt. Natomiast podobnie jak Fu i wsp. (2013) stwierdzono obecność białek takich jak: alfa-2HS-glikoproteina (fetuina A, AHSG), apolipoproteina AI (APOA1). Fetuina A jest krążącą glikoproteina, występującą w wysokich stężeniach we krwi i uważa się, że białko to jest inhibitorem procesu wapnienia tętnic (Ix i wsp., 2012). Natomiast apolipoproteina AI sama lub jako składnik cząstek lipoprotein o dużej gęstości ma również właściwości przeciwmiażdżycowe. Zależny od wieku spadek poziomu tego białka może powodować zwiększone ryzyko rozwoju okluzyjnej choroby wieńcowej u starszych osobników (Nakamura i wsp., 1999). Ponadto w niniejszej pracy zidentyfikowano również białka macierzy zewnątrzkomórkowej: łańcuch alfa 1 kolagenu VI (COL6A1) i łańcuch alfa 2 kolagenu VI (COL6A2), podczas gdy Fu i wsp. (2013) wykazali obecność łańcucha alfa 1 i 2 kolagenu typ I (COL1A1, COL1A2).

Mapy referencyjne jako nowoczesne narzędzia stanowią istotne odniesienie w badaniach skierowanych na charakterystykę zmian w profilach białkowych zachodzących pod wpływem zmienionych warunków fizjologicznych, procesów patologicznych czy pod wpływem działania wybranego czynnika doświadczalnego. W piśmiennictwie naukowym niewiele jest prac z zakresu proteomu aorty i innych naczyń układu krążenia u świni. Przedstawiona w niniejszej pracy mapa białkowa aorty jest jedną z pierwszych map proteomicznych tej tkanki u świni. Daje to możliwość dalszych badań aorty u *Sus scrofa*, a także u innych gatunków zwierząt. Zmapowana tkanka aorty tego gatunku z wykorzystaniem strategii „omicznych” może stanowić wsparcie diagnostyczne i prognostyczne, w profilaktyce i/lub prewencji zootechniczno-weterynaryjnej. Należy również podkreślić iż w celu upowszechniania badań proteomicznych poszczególnych narządów (tkanek) oraz poprawy użyteczności tego gatunku jako modelu badawczego w badaniach klinicznych człowieka, niezbędne staje się systematyczne tworzenie katalogów proteomicznych ulokowanych we wspólnym repozytorium. Znajomość składu białkowego tkanek u świń pozwoli również uzupełnić szczegółowe informacje dotyczące różnic i podobieństw funkcjonowania organizmu na poziomie molekularnym. Uzyskana mapa białkowa aorty w przedstawionym doświadczeniu może być istotnym dopełnieniem badań proteomicznych u tego gatunku zwierząt gospodarskich, ze względu na niekompletną jeszcze bazę związaną z masą

peptydów poszczególnych białek. Niekompletna bowiem baza utrudnia poszukiwanie rzeczywistej sekwencji białka świńskiego, a homologiczne sekwencje białek innych gatunków zwierząt, które nie są wystarczająco identyczne, nie przynoszą odpowiednio wysokiego rezultatu właściwego ich dopasowania w trakcie analizy spektrometrii mas. Mapa białkowa uzyskana w prezentowanej pracy poza uzupełnieniem obecnie dostępnych profili białkowych u młodych rosnących prosiąt na żelach po elektroforezie dwukierunkowej może być odniesieniem do monitorowania zmian w odpowiedzi na czynniki fizjologiczne i patologiczne.

Ponadto należy podkreślić, że świnia stanowi bardzo ważny model badawczy w biomedycynie człowieka. Jak podaje Bendixen i wsp. (2011) ze względu na duże podobieństwo tego gatunku do człowieka zarówno pod względem żywienia, metabolizmu oraz wielkości i fizjologii narządów staje się bardzo dobrym modelem zwierzęcym w porównaniu do zwierząt laboratoryjnych. Ostatnie badania wskazują, że świnia stała się ważnym modelem badawczym wykorzystywanym w badaniach układu krążenia, układu pokarmowego, cukrzycy, nowotworów, a także w okulistyce i leczeniu ran oraz oparzeń. Dotychczasowe badania proteomiczne związane z tym gatunkiem zwierząt dotyczą próby poznania molekularnego podłoża patogenezы chorób człowieka oraz poszukiwania biomarkerów wczesnego rozpoznania różnych schorzeń oraz testuje się i rozwija nowe terapie. (Bendixen i wsp., 2010).

Prather i wsp. (2008) podają, że ten gatunek zwierząt gospodarskich spełnia również kryteria przydatności tkanek i organów do ksenotransplantacji. Autorzy przeprowadzili badania genetyczne związane z międzygatunkową homologią DNA, w których wykazali, że genom świński w porównaniu do gryzoni jest trzy razy bliższy genomowi człowieka.

Ponieważ analiza genomu okazuje się jednak być niewystarczająca do określenia przyczyn powstawania różnych zmian w zawartości komórki, stąd niezbędnym uzupełnieniem genomu jest proteom. Aby zrozumieć przebieg procesów fizjologicznych, ważna jest znajomość poziomu ekspresji, struktury i funkcji białek.

Jakość i wartość informacji otrzymanej w wyniku analizy jest bardzo uzależniona od metody przygotowania próbki i wymaga wykorzystania niezwykle precyzyjnych i niezawodnych metod pozwalających na wiarygodną ocenę aktualnego stanu tkanki. Zastosowanie różnych technik proteomicznych (elektroforeza 2DE, spektrometria mas typu MALDI-TOF) pozwoliło na określenie szerokiej gamy białek reprezentujących

proteom tkanki aorty u świni, co potwierdzają wyniki opisanych badań profili białkowych przez naukowców oraz rezultaty prezentowanej pracy.

Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych białek tkanki aorty u rosnących świń za pomocą programu bioinformatycznego STRING v.10 wykazała, że pod względem udziału w procesach biologicznych duża część białek bierze udział w procesach komórkowych. Według Uhlen'a i wsp. (2015) białka te pełnią ważną rolę w utrzymaniu podstawowych funkcji oraz struktury wszystkich typów komórek. Wśród tych białek znajdują się białka rybosomalne regulujące procesy syntezy, enzymy odpowiedzialne za kontrolę metabolizmu komórkowego oraz białka, które zaangażowane są w utrzymywanie strukturalnej integralności komórek. Ponadto jak podaje Uhlen i wsp. (2015) znaczna część tych produktów genowych ulega ekspresji na podobnym poziomie w pozostałych tkankach organizmu.

W prezentowanej pracy w procesy komórkowe zaangażowanych było 19 białek. Wykazano m. in. obecność mitochondrialnej dehydrogenazy alkoholowej, która w pośredni sposób odgrywa ważną rolę w regulowaniu napięcia ściany naczyń krwionośnych poprzez biokonwersję np. triazotanu glicerolu (GTN) do tlenu azotu, który powoduje wazorelaksację mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Kolejnym charakterystycznym białkiem zaangażowanym w procesy komórkowe jest peroksyredoksyna 6. Jest to enzym biorący udział w procesach antyoksydacyjnych, który posiada zdolność utleniania nadtlenku wodoru (H_2O_2), wodoronadtlenków lipidowych oraz neutralizowania nadtlenoazotynów ($ONOO^-$) w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (Lee i wsp., 2007). Jak podają Urbański i wsp. (2013) utrzymanie odpowiedniej homeostazy naczyń krwionośnych ma ścisły związek z produkcją reaktywnych form tlenu i azotu w ścianie naczyń krwionośnych. Stres oksydacyjny przyczynia się do powstawania dysfunkcji śródbłonna naczyń, medii i przydanki, poprzez nasiloną proliferację i migrację komórek mięśniówki gładkiej, powodując stany zapalne, a także wpływa na procesy apoptozy (Urbański i wsp., 2013).

Spośród zidentyfikowanych białek należących do grupy białek zaangażowanych w procesy komórkowe szczególną rolę zwracają również wimentyna (VIM), białko szoku cieplnego 70 kDa (HSPA4), apolipoproteina A-1 (APOA1), kalretikulina (CALR). W biologii naczyń krwionośnych są to białka biorące udział w transporcie cholesterolu, apoptozie i adhezji komórek. Jak podaje Yao i wsp. (2013) APOA1 jest główną apolipoproteiną działającą przeciwmiażdżycowo. Działa również jako kofaktor acylotransferazy lecytyno-cholesterolowej (LCAT). Ma to ogromne znaczenie dla

fizjologii naczyń krwionośnych, ponieważ związane jest to z usuwaniem nadmiaru cholesterolu z tkanek i włączaniem go do HDL w celu zwrotnego transportu do wątroby. O'Brien i wsp. (1995) stwierdzili, że zmniejszona ilość APOA1 zwiększa akumulację cholesterolu w ścianach tętnic, co może powodować wczesne tworzenie blaszek miażdżycowych.

W mechanizmach komórkowych szczególną rolę pełni również zidentyfikowane białko HSPA4, należące do rodziny białek chroniących komórki przed szkodliwymi czynnikami oraz uczestniczących w fałdowaniu białek i ich zmian konformacyjnych. Shamaei-Tousi i wsp. (2007) twierdzą, iż egzogenny stres jest przyczyną nieprawidłowego fałdowania białek komórkowych. Według autorów gromadzenie się w komórce nieprawidłowo sfałdowanych białek, może prowadzić do uszkodzenia naczyń krwionośnych. HSPA4 stojąc na straży właściwej funkcji naczyń krwionośnych przyczynia się również do prawidłowego funkcjonowania śródbłonna oraz bierze udział w mechanizmach antyapoptotycznych chroniących mięsień sercowy przed niedotlenieniem.

Zidentyfikowana w komórkach ścian aorty prosiąt wimentyna należąca również do białek biorących udział w procesach komórkowych jest białkiem cytoszkieletowym. Qin i wsp. (2000) donoszą iż wimentyna jest białkiem biorącym udział w proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC). Należy zwrócić uwagę, że komórki mięśni gładkich naczyń są wysoko wyspecjalizowanymi komórkami regulującym napięcie naczyń i biorącymi udział w przebudowie naczyń w warunkach fizjologicznych (Regent i wsp., 2016). Ponadto funkcja tych komórek związana jest również z proliferacją oraz syntezą składników macierzy pozakomórkowej. Jak podają Regent i wsp. (2016) kurczliwość VSMC wyraża wysoki poziom białek kurczliwych takich jak: łańcuch ciężki miozyny mięśni gładkich (SM-MHC), α -aktyna mięśni gładkich (α SMA) oraz kalponina (CNN).

Ponadto wimentyna reguluje adhezję i migrację leukocytów przez śródbłonek naczyń krwionośnych. Pomaga również stabilizować połączenia międzykomórkowe w śródbłonku naczyń. Loufrani i Henrion (2008) podają, że ilość wimentyny w filamentach pośrednich wzrasta po ekspozycji na wysokie ciśnienie krwi, wzmacniając w ten sposób architekturę komórkową.

Wśród zidentyfikowanych białek zaangażowanych również w procesy komórkowe na uwagę zasługuje kalretikulina. Jest to molekularne białko opiekuńcze wiążące wapń mające kluczowe znaczenie dla prawidłowego fałdowania i transportu

białek przez retikulum endoplazmatyczne (Gold i wsp., 2006). Autorzy ponadto stwierdzili, że kalretikulina jest również receptorem dla trombospondyny 1 (TSP-1, bierze udział w procesie angiogenezy) w tętnicznych komórkach śródbłonna u bydła.

Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych białek tkanki aorty za pomocą oprogramowania STRING v.10 wykazała, że pod względem udziału w procesach biologicznych część białek jest zaangażowana w organizację cytoszkieletu. Cytoszkielet jest ważnym składnikiem ścian naczyń krwionośnych, ponieważ jest odpowiedzialny za utrzymanie integralności naczyniowej. Ponadto białka cytoszkieletu odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji skurczu oraz relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Wśród białek cytoszkieletarnych tkanki aorty wykazano obecność aneksyny A1 (ANXA1). Białko to powoduje zmniejszoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, a tym samym ogranicza przyleganie i przenikanie leukocytów w kierunku procesu zapalnego (de Jong i wsp., 2017). Badania przeprowadzone przez Hayhoe i wsp. (2006) i Knusters'a i wsp. (2015) potwierdzają hipotezę, że podanie ANXA1 hamuje przyleganie neutrofilii do aktywowanych komórek śródbłonna w warunkach *in vitro*.

Aneksyna A1 należy do białek odgrywająca kluczową rolę w fizjologicznej równowadze angiogennej. Jak podają Yi i Schnitzer, (2009) zwiększona ekspresja ANXA1 w komórkach ścian naczyń krwionośnych prawdopodobnie pełni bardzo ważną funkcję w rozwoju naczyń krwionośnych. Ponadto autorzy stwierdzili istotną rolę ekspresji aneksyny A1 w procesie gojenia się ran i angiogenezy w powszechnie wykorzystywanym teście badania poszczególnych odcinków aorty. Bardzo ważnym aspektem jest wskazanie przez autorów (Yi i Schnitzer, 2009) nowych szlaków działania aneksyny A1 w regulacji angiogenezy. Autorzy postulują iż zwiększona ekspresja czynników antyangiogennych (TIMP2, Col18a1) wydaje się być równoważona przez zwiększoną ekspresję czynników proangiogennych (MMP2, FIGF, ECGF1, Akt1 i Angpt2). Celem wzajemnego działania tych czynników jest utrzymanie równowagi fizjologicznej umożliwiającej prawidłową funkcję naczyń krwionośnych. Prawdopodobnie sama obecność aneksyny A1 w aorcie rosnących prosiąt wskazują na intensywny rozwój naczyń krwionośnych.

Cytoszkielet pełni bardzo ważną funkcję mechaniczną, organizacji i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Różnorodność funkcji cytoszkieletu sprawia, iż pełni on istotne znaczenie w utrzymaniu prawidłowej fizjologii naczyń krwionośnych. Do białek cytoszkieletu należy zidentyfikowana w aorcie prosiąt cytoplazmatyczna aktyna 1 (ACTB) mająca kluczowe znaczenie w utrzymaniu formy i funkcji komórek naczyń

krwionośnych. Aktyna wchodzi w skład dużej rodziny białek cytoszkieletowych znajdujących się prawie we wszystkich komórkach eukariotycznych i pełni funkcję rusztowania utrzymującego kształt komórki oraz wpływa na organizację wewnątrzkomórkową. Jak podają Whitesell i wsp. (2014) alfa aktyna mięśni gładkich (ACTA2) komórek mięśni gładkich należy do jednych z pierwszych markerów rozwoju układu naczyniowego. Autorzy obserwowali w trakcie rozwoju danio pręgowanego, morfogenezę naczyń krwionośnych, w tym łuku aorty wraz ze wzrostem aktywności aktyny w komórkach. Ponadto autorzy postulują iż ACTA2 odgrywa centralną rolę w regulacji kurczliwości naczyń i homeostazy ciśnienia krwi. Przeciwny kierunek zmian i roli ACTA2 obserwowali Zhao i wsp. (2004). W przeprowadzonych badaniach na rosnących i dorosłych owcach metodą Western immunoblotingu stwierdzili, względnie stały poziom ekspresji alfa aktyny podczas rozwoju naczyń krwionośnych. Autorzy ci jednak odrzucają hipotezę, że alfa aktyna stanowi istotny czynnik wpływający na zmiany kurczliwości naczyń związane z wiekiem. Ponadto uważają iż stabilny poziom ekspresji alfa aktyny w trakcie wzrostu i rozwoju zwierząt może stanowić wewnętrzny kalibrant (kontrola) w badaniach ekspresji innych białek. W przeciwieństwie do stałego poziomu alfa aktyny autorzy wykazali znaczące obniżenie ekspresji alfa tubuliny i niewielką jej rolę w kurczliwości naczyń krwionośnych. Tym samym alfa tubulina nie może stanowić wewnętrznej kontroli ekspresji białka. Łańcuch tubuliny alfa-1B (TUBA1B) zidentyfikowana również w prezentowanej pracy będąca składową mikrotubul wzmacnia właściwości mechaniczne naczyń krwionośnych, a przede wszystkim odgrywa kluczową rolę w modulowaniu wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału wapnia (Paul i wsp., 2000)

Białka cytoszkieletowe określają kształt i integralność komórek, a struktury związane z błoną komórkową, które połączone są za pomocą komponentów zewnątrzkomórkowych umożliwiają integralność tkanki. Te elementy strukturalne odgrywają aktywną rolę w interakcji naczyń krwionośnych z ich środowiskiem.

Wiadomo, że na ściany naczyń krwionośnych działają dwie siły biomechaniczne. Jedną z nich jest bardzo istotna z punktu widzenia patomechanizmu miażdżycy i stanowi śródbłonkowe tzw. naprężenie ścinające. Działanie tej siły ogranicza się do komórek wyścielających naczynia i związane jest z lepkością krwi. Siłą jaką jest naprężenie ścinające wywołane przepływem krwi jest bardzo ważnym czynnikiem stymulującym śródbłonek naczyń krwionośnych (Wasilewski i wsp., 2012).

W śródbłonku naczyń krwionośnych białka cytoszkieletu do których należy wcześniej wspomniana wimentyna, (zidentyfikowana w niniejszym doświadczeniu), wykazują odpowiednią reaktywność uzależnioną od wielkości siły naprężenia ścinającego przepływającej krwi przez naczynia krwionośne. Wimentyna jako białko cytoszkieletu komórkowego ma więc duże znaczenie w utrzymaniu integralności komórek jak i całej struktury tkanki aortalnej w organizmie zwierząt i ludzi. Sieć wimentynowa odgrywa ważną rolę w stabilizacji komórki. Warto również dodać, że białka cytoszkieletu odgrywają również kluczową rolę w aktywności komórek w angiogenezie związanej z rozwojem naczyń.

Analiza bioinformatyczna wykazała również białka zaangażowane w procesy agregacji i aktywacji płytek. Proces agregacji płytek można podzielić na dwa rodzaje hemostatyczną (w momencie uszkodzenia naczynia) i patologiczną (gdy dochodzi do dysfunkcji układu antykoagulacyjnego). Zaktywowane płytki krwi mają zdolność do modulowania właściwości komórek śródbłonka, przez wzmożoną ekspresję czynnika tkankowego, co prowadzi do zwiększenia w naczyniach aktywności prokoagulacyjnej (Maślanka, 2014). W prezentowanej pracy wykazano obecność m.in. winkuliny (VCL), cytoplazmatycznej aktyny 1 (ACTB) oraz regulowanego lekkiego polipeptydu 9 miozyny (MYL9). Obecność winkuliny jest niezbędna dla integralności komórek ściany aorty i zachowania prawidłowej funkcji naczyń krwionośnych.

W dostępnym piśmiennictwie nie wiele jest prac związanych z proteomiką aorty u *Sus scrofa*. Dinardo i wsp. (2014) dokonali analizy proteomicznej komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMCs, ang. *vascular smooth muscle cells*) wyizolowanych z aorty piersiowej świń. W swoim doświadczeniu autorzy wykorzystali technikę dwukierunkowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w wyniku której otrzymali 1628 białek, spośród których 232 zostały zidentyfikowane za pomocą kwadrupolowej spektrometrii mas. Autorzy wykazali obecność białek zaangażowanych w organizację włókien aktynowych (izoforma 2 winkuliny, alfa aktynina 2 oraz 4). Obecność białek izoformy 2 winkuliny oraz alfa aktyninę 1 podobnie obserwowano w niniejszej pracy. Białka te odgrywają ważną rolę w określaniu mechaniki komórek poprzez reorganizację włókien aktyny, które spowodowane są cyklicznym rozciąganiem ściany naczyń krwionośnych. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Boccardi i wsp. (2007) na 3 miesięcznych świnich od których pobrano fragmenty tętnicy wieńcowej w celu wyizolowania VSMCs, za pomocą elektroforezy dwukierunkowej autorzy otrzymali 259 spotów białkowych. Spośród wszystkich spotów, autorzy

zidentyfikowali białka, należące do grupy białek zaangażowanych w system antyoksydacyjny. Do tych białek należą peroksyredoksyna 3 i 4, natomiast w niniejszej pracy zidentyfikowano peroksyredoksynę 6. Boccardi i wsp. (2007) podają, że nadekspresja tego białka może być konsekwencją wtórnego mechanizmu zaangażowanego w odpowiedź na wzrost poziomu reaktywnych form tlenu. Reaktywne formy tlenu przyczyniają się do zmian funkcjonalnych i strukturalnych ściany naczyń krwionośnych (np. występowanie tętniaków u ludzi). Podobnie jak autorzy cytowanej pracy w prezentowanym doświadczeniu wykazano obecność białek opiekuńczych z rodziny białek szoku cieplnego o masie 70 (HSPA4) i 71 kDa (HSPA8). Białka te w warunkach stresu oksydacyjnego biorą udział w stabilizacji mikrofilamentów aktynowych, a także zapobiegają agregacji płytek krwi do ściany naczyń krwionośnych (Marszał, 2010). Ponadto w tkance aorty badanych prosiąt w naszym doświadczeniu jak również w badaniach 3 miesięcznych prosiąt przez Boccardi i wsp. (2007), wykazano obecność chaperonów retikulum endoplazmatycznego takich jak: prekursor białkowej izomerazy dwusiarczkowej A3 (PDIA3 – enzym odpowiadający za tworzenie mostków dwusiarczkowych podczas dojrzewania białek w retikulum endoplazmatycznym) oraz prekursor retikulokalbiny 1 (RCN1), izoforma 1 i 3 retikulokalbiny 2 (RCN2). Wartością dodaną przeprowadzonych badań niniejszej pracy jest zidentyfikowanie również 6 innych białek retikulum endoplazmatycznego, nie wykazanych przez cytowanych autorów. Wśród nich można wymienić białka zaangażowane w wiązanie jonów wapniowych, takie jak: kalretikulina (CALR), izoforma 1 kalumeniny (CALU) oraz endoplazmina (HSP90B1). Ponadto zidentyfikowano również izoformę 2 białka o masie 78 kDa regulowanego poziomem glikozy (HSPA5, uczestniczy w fałdowaniu i przemieszczaniu białek sekrecyjnych w retikulum endoplazmatycznym) oraz przejściową ATPazę retikulum endoplazmatycznego (VCP).

W niniejszym badaniu, aby wzbogacić wiedzę z zakresu biologii i fizjologii aorty rosnących prosiąt, wygenerowano pierwszą szczegółową i powtarzalną mapę białkową poprzez separacje białek z wykorzystaniem elektroforezy 2DE oraz dokonano identyfikacji umożliwiającej zbadanie zmian ekspresji białek związanymi z różnymi stanami układu biologicznego. Mapa białkowa prezentuje spora liczbę i różnorodność zidentyfikowanych białek związanych w szczególności z funkcją i rozwojem naczyń krwionośnych u rosnących prosiąt.

Podjęcie proteomiczne, w badaniach czynności układu sercowo - naczyniowego, wydaje się być bardzo zachęcające w mapowaniu profili ekspresji białek po stosowaniu różnych czynników doświadczalnych w tym zmiany diety u rosnących zwierząt. W tym kontekście wydaje się, że wyniki są bardzo obiecujące i otwierają nowe możliwości dla przyszłych badań skupionych na wyjaśnieniu fizjologii i patofizjologii rozwijającego się organizmu. Wykorzystanie narzędzi proteomicznych w badaniach czynności aorty zaczyna nabierać coraz większego znaczenia, szczególnie w wyjaśnieniu mechanizmów funkcjonowania tej tkanki.

6.1. Analiza zmian ekspresji białek po zastosowaniu diety suplementowanej fruktanami typu inulinowego

Charakterystyka fizjologicznej homeostazy białek w zdrowych tkankach umożliwia identyfikację molekularnych podstaw procesów biologicznych pod wpływem różnych czynników doświadczalnych. W prezentowanym doświadczeniu dokonano analizy wpływu diety z różnym udziałem fruktanów typu inulinowego, na profil białkowy aorty rosnących prosiąt. Należy podkreślić, że pozyskane zostały białka z próbek aorty, w których widoczne są skutki lokalnego działania inuliny na tkankę aortalną i naturalną zmienność biologiczną.

Zastosowanie elektroforezy dwukierunkowej pozwoliło określić różnice w ekspresji białek tkanki aorty, między grupą kontrolną i grupami eksperymentalnymi. W prezentowanej pracy zaobserwowano, że dieta suplementowana dodatkiem suszu z korzenia cykorii spowodowała większe zmiany ilościowe ekspresji białek tej tkanki. Jak podają Liu i wsp. (2011) korzenie cykorii zawierają fruktany typu inulinowego oraz bioaktywne składniki tj. polifenole (kwasy dikawoilochinowe oraz kwas chlorogenowy). Ponadto susz z korzenia cykorii zawiera fruktany o różnym stopniu polimeryzacji co wiąże się z odmienną fermentacją i związanym z tym działaniem. Dieta z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii spowodowała zmiany w ekspresji 32 białek, z których zidentyfikowano 19, reprezentujących 15 różnych produktów genowych. Natomiast dodatek do diety 2% wodnego roztworu inuliny wpłynął na zmiany w ekspresji 23 białek aorty. Spośród tych białek zidentyfikowano 13, które reprezentują 12 odrębnych produktów genowych.

Suplementacja diety fruktanami typu inulinowego wywołała zmiany w ekspresji białek zarówno w grupie otrzymującej 2% i 4% dodatek fruktanów typu inulinowego. Zarówno dodatek suszu z korzenia cykorii jak i 2% roztworu inuliny skutkował

obniżeniem ekspresji tych samych białek: izoformy 3 retikulokalbiny 2 (RCN2), białka szoku cieplnego A8 (HSPA8), podjednostki alfa białka 1 kompleksu T (TCP1), alfa 1 kwaśnej glikoproteiny (ORM1) oraz prelamininy A/C (LMNA).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zastosowanie w diecie świń dodatku 2% natywnej inuliny oraz 4% suszu z korzenia cykorii istotnie wpłynęło na poziom ekspresji białek zaangażowanych w mechanizmy regulujące ciśnienie krwi w aorcie. Do białek tych należą izoforma 3 retikulokalbiny 2 (RCN2), alfa 1 kwaśna glikoproteina (ORM1) oraz białko zawierające domenę tioredoksyny 5 (TXNDC5). W przypadku ORM1 oraz RCN2 obserwowano istotne obniżenie ekspresji wynikające z zastosowania diet eksperymentalnych, natomiast ekspresja TXNDC5 wzrastała w wyniku suplementacji zwierząt. ORM1 jest glikoproteina o funkcji naczynioprotekcyjnej (McCurdy i wsp., 2012). Analiza piśmiennictwa wskazuje, że stwierdzono wysoką osoczową koncentrację tego białka, która istotnie wzrasta w odpowiedzi ostrej fazy (Tothova i wsp., 2013). Związane jest to z działaniem przeciwrzepliwym ORM1 poprzez regulację aktywności inhibitora aktywatora plasminogenu typu 1 (PAI-1) (Smolarczyk i wsp., 2005). W doświadczeniach przeprowadzonych na skrawkach mysiej aorty wykazano, że ORM1 ma również działanie wazodylatacyjne, najprawdopodobniej poprzez blokowanie napływu jonów Ca^{2+} do komórek mięśniówki gładkiej tych naczyń (Tokutomi i wsp., 2003). Należy nadmienić, że w badaniach Lepczyńskiego i wsp. (2015) oraz Herosimczyk i wsp. (2016) przeprowadzonych na tej samej stawce zwierząt wykazano obniżenie ekspresji białek ostrej fazy w surowicy krwi prosiąt suplementowanych suszem z korzenia cykorii oraz inuliną. Dlatego też, wydaje się, że zmiany relatywnej koncentracji alfa 1 kwaśnej glikoproteiny w aortach suplementowanych zwierząt, mogą być wynikiem jej obniżonej ekspresji w osoczu krwi, jako efektu działania przeciwzapalnego fruktanów typu inulinowego. Wyniki te ilustrują potencjalną użyteczność stosowania proteomiki tkankowej (w tym przypadku aorty) do identyfikacji biomarkerów osocza i dostarczają dowodów na użyteczność kliniczno – weterynaryjną.

W badaniach zaobserwowano również niższą ekspresję izoformy 3 retikulokalbiny 2 (RCN2) w aortach suplementowanych zwierząt. Z analizy piśmiennictwa wynika, że RCN2 odgrywa bardzo istotną rolę w prawidłowej funkcji i czynności komórek w normalnej fizjologii organizmu. Wiadomym jest bowiem, że obecność RCN2 stwierdzono w wielu narządach i tkankach ustroju. Jednak jak podają Fukuda i wsp. (2007) ilość RCN utrzymuje się na bardzo niskim poziomie, ponieważ

większość białek z rodziny RCN zostało zidentyfikowanych w małych ilościach w różnych narządach. Wykazano, że niska ekspresja tego białka wiązana jest również z ograniczeniem działania presyjnego angiotensyny II (Li i wsp., 2019). Wysoka ekspresja RCN2 stwierdzona była w trakcie remodelingu naczyń tętniczych, wywołanego wysokim ciśnieniem tętniczym (Chang i wsp., 2019). Można więc przypuszczać, że spadek ekspresji tego białka będzie wiązał się z ograniczaniem wzrostu ciśnienia krwi.

W doświadczeniu wykazano również wzrost ekspresji białka zawierającego domenę tioredoksyny 5 (TXNDC5). Wiadomym jest, że funkcją fizjologiczną śródbłonna naczyniowego, a tym samym naczyń jest utrzymanie prawidłowej równowagi między układem wytwarzającym utleniacz a układem wytwarzającym przeciwutleniacze. Zakłócenie tej równowagi prowadzi do stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny pełni główną rolę w zaburzeniach naczyń krwionośnych. Nadprodukcja reaktywnych form tlenu w naczyniach krwionośnych jest wynikiem zwiększonej ekspresji oksydazy NADPH i obniżonej aktywności czynników przeciwutleniających, do których możemy zaliczyć m.in. TXNDC5. Wiadomym jest również, że w prawidłowej fizjologii naczyń krwionośnych tioredoksyny są zaangażowane w homeostazę komórek śródbłonna. Dlatego wzrost ekspresji tego białka w aorcie rosnących prosiąt pod wpływem dodatku fruktanów typu inulinowego może stanowić mechanizm ochronny w funkcjonowaniu śródbłonna naczyniowego (Bedarida i wsp., 2018; Domingues i wsp., 2020). W niniejszych badaniach wykazano również obniżenie ekspresji molekularnych chaperonów (prekursor kalreticuliny (CALR), podjednostka alfa białka 1 kompleksu T (TCP1), białko szoku cieplnego A8 (HSPA8)). Te białka opiekuńcze związane są przede wszystkim z procesem prawidłowego formowania białek w siateczce śródplazmatycznej gładkiej (Biwer i wsp., 2020; Chang i wsp., 2020). Ze względu na fakt, że ekspresja tych białek indukowana jest stresem komórkowym, dużym prawdopodobieństwem jest, że zastosowanie w diecie dodatku suszu z korzenia cykorii oraz natywnej inuliny powodują ograniczenie działania czynników stresogennych na komórki śródbłonna oraz mięśniówki gładkiej formujących aortę. Należy dodatkowo zwrócić uwagę na fakt iż, białka te mogą posiadać dodatkową rolę związaną z funkcjonowaniem tego naczynia. Wykazano, że pula CALR nie związana z siateczką śródplazmatyczną gładką, może poprzez wiązanie jonów wapnia regulować wazoreaktywność tętnic. Wywołują to zmiany aktywności połączeń mięśniowo-śródbłonkowych uczestniczących w fizjologicznym mechanizmie regulacji ciśnienia krwi (Biwer i wsp., 2014; Biwer

i wsp., 2018). Profil ekspresji białek zaangażowanych w komórkową odpowiedź stresową, takich jak HSPA8 zostały obniżone w odpowiedzi na dodatek zarówno 2% inuliny i 4% dodatek suszu do diety, natomiast CALR tylko w przypadku suplementacji diety 2% inuliny. Zrozumienie dokładnego mechanizmu obniżania ekspresji HSPA8 i CALR pod wpływem diety inulinowej pomogłoby w lepszym zrozumieniu funkcjonowania dużych naczyń krwionośnych pod wpływem zastosowanych warunków żywieniowych. Białka szoku cieplnego odpowiedzialne są za procesy zwijania i fałdowania nowo syntetyzowanych białek, aż także za resyntezę wcześniej źle sfałdowanych białek. Ponadto odpowiadają również za translokację białek błonowych otaczających organella oraz kontrolę aktywności białek regulatorowych. Właściwości białek szoku cieplnego i ich działanie jest ściśle związane z oddziaływaniem na hydrofobowe segmenty białek w sposób kontrolowany przez ATP. Białka z rodziny szoku cieplnego (HSP) poprzez oddziaływanie z różnymi białkami regulatorowymi wielu szlaków transdukcji sygnałów, kontrolują homeostazę komórek, proliferację, różnicowanie i śmierć komórek. Innym białkiem zaangażowanym w kontrolę procesów redoks (redukcyjno-oksydacyjnych) jest izomeraza dwusiarczkowa (PDIA3). W niniejszym doświadczeniu PDIA3 reprezentowana była przez trzy spoty białkowe, których trend w ekspresji nie jest jednoznaczny (jeden ze spotów wykazywał wzrost ekspresji natomiast pozostałe obniżały swoją ekspresję). Prawdopodobnie obserwowany odmienny trend ekspresji dla spotów reprezentujących PDIA3 może wynikać z obecności w żelu białek o określonych modyfikacjach potranslacyjnych (PTM). W wyniku określonych modyfikacji m.in. fosforylacji dochodzi do przesunięcia punktów izoelektrycznych białek (Rogowska-Wrzesińska i wsp., 2013), stąd też w doświadczeniu można zaobserwować zmiany ekspresji spotów białkowych o określonych funkcjonalnych modyfikacjach, przy stabilnej lub odmiennej ekspresji pozostałych spotów reprezentujących na żelu określone białko. Niestety ze względu na ograniczenia stosowanego w przeprowadzonej analizie spektrometru masowego typu MALDI-ToF, nie możliwe było określenie modyfikacji potranslacyjnych dla tego białka. Z danych dostępnych w bazie danych uniprot wynika, że PDIA3 może ulegać szeregowi potranslacyjnych modyfikacji m.in. fosforylacji. Jak podają Turano i wsp. (2011) nadekspresja tego białka może świadczyć o przeciwdziałaniu niektórym wywołanym skutkom stresu oksydacyjnego, związanego z nieprawidłowym fałdowaniem białka, uszkodzenia spowodowanego przez reaktywne formy tlenu (ROS). W badaniach Lepczyńskiego i wsp. (2017) przeprowadzonych na tych samych grupach prosiąt dodatek

do diety suszu z korzenia cykorii, zwiększył ekspresje białek które są pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane w aktywność antyoksydacyjną, np. dysmutaza ponadlenkowa i preksyredoksyna 5 i 6, S-transferaza glutationu. Gourineni i wsp. (2011) podają, że końcowy produkt prebiotyków m.in. inuliny może zwiększyć aktywność różnych enzymów antyoksydacyjnych. Jak podaje Lepczyński i wsp. (2017) suszone korzenie cykorii mają wysokie właściwości przeciwutleniające związane z cechami związków polifenolowych, które powszechnie występują w cykorii odmiany korzeniowej.

Wzrost ekspresji tych białek pod wpływem diety inulinowej może mieć duże znaczenie w prawidłowym rozwoju układu naczyniowego oraz wzmocnieniu mechanizmów obronnych przed nadmiarem wolnych rodników w organizmie zwierząt i ludzi.

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że dodatek suszu z korzenia cykorii do diety świń powodował zmiany ekspresji białek związanych z przyczepami ogniskowymi w aortach świń (wimentyna (VIM), izoforma 3 winkuliny (VCL), białko zależne od aktyny 3 ACTR3). Wymienione wyżej białka należą do rodziny białek związanych z organizacją cytoszkieletu wewnątrzkomórkowego.

Dieta z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii spowodowała zmiany w ekspresji białka cytoszkieletu, należącego do białek strukturalnych – wimentyny (VIM). W niniejszym doświadczeniu stwierdzono obecność VIM w dwóch osobnych spotach na żelu, w których obserwowana była asymetria w ekspresji tego białka. Różnice te prawdopodobnie mogą być wynikiem występowania różnych modyfikacji potranslacyjnych.

Wimentyna jest białkiem filamentów pośrednich (IF) komórek śródbłonna, które tworzą warstwę w świetle naczyń krwionośnych i stanowią pierwszą barierę przed naprężeniem ścinającym przepływu krwi w układzie naczyniowym. Wiadomo, że filamety pośrednie zapewniają komórkom stabilność mechaniczną. Jednakże wyniki wielu badań wskazują, że IF zaangażowane są w szereg procesów metabolicznych, sygnalizacyjnych i regulacyjnych, które nie są związane z funkcjami mechanicznymi (Schiffers i wsp., 2000; Ivaska i wsp., 2005; Nieminen i wsp., 2006; Ivaska i wsp., 2007; Kwak i wsp., 2012). Wykazano, że wimentyna działa jako rusztowanie dla białek sygnałowych, które regulują nabłonkową przemianę mezenchymalną, rozwój komórek rakowych, gojenie ran, naprawę tkanek, starzenie się tkanek, jak również w sygnalizację zapalną (Ivaska i wsp., 2005; Nieminen i wsp., 2006; Ivaska i wsp., 2007; Hyder i wsp.,

2011, Virtakoivu i wsp., 2015). W celu regulacji, adhezji i migracji komórek, wimentyna bierze udział w organizacji cząsteczek adhezyjnych, jak również kompleksów aktomiozyny (Jiu i wsp., 2015). Wimentyna reguluje również transport białek i bierze udział w regulacji ekspresji genów (Ivaska i wsp., 2007; Vuoriluoto i wsp., 2011; Dave i Bayless, 2014; dos Santos i wsp., 2015; Virtakoivu i wsp., 2015). Na podstawie wyników badań można stwierdzić, że wimentyna pełni funkcję regulacyjną w dynamicznych procesach komórkowych. W ostatnich badaniach wimentynę powiązano z angiogenezą i homeostazą naczyniową. Stwierdzono, że brak wimentyny jest związany z defektami rozwoju naczyń, migracją śródbłonna, adhezją jak również z przebudową tętnic związaną z indukowanym przepływem krwi (Schiffers i wsp., 2000; Kwak i wsp., 2012).

Istnieje coraz więcej dowodów, że filamenty wimentynowe tworzą dynamiczne rusztowanie białkowe, które ingeruje w procesy komórkowe podczas etapów rozwoju tkanek lub przebudowy. Autorzy (Antfolk i wsp., 2017) wykazali ważną rolę wimentyny w równoważeniu sygnalizacji NOTCH, w procesie angiogenezy. Stwierdzili również, że wimentyna pełni ważne funkcje na różnych etapach rozwoju naczyń i wykazali oddziaływanie wimentyny z JAGGET. Zdolność wysyłania sygnału przez JAGGET jest osłabiona w przypadku braku wimentyny. Ma to szczególne znaczenie w trakcie wzrostu i rozwoju naczyń krwionośnych (również w trakcie wzrostu i rozwoju młodych zwierząt), gdzie wimentyna związana z aktyną umożliwia koordynację sygnału cytoszkieletu z receptorami JAGGET i NOTCH w błonie komórkowej (Antfolk i wsp., 2017). Doświadczalnie wykazano, że wimentyna zaangażowana jest w funkcjonalną regulację sztywności naczyń tętniczych. U myszy z nokautem genu wimentyny obserwowano wzrost ekspresji szeregu białek laminin, witronektyny, fibronektyny, perlecanu, kolagenu typu IV, VE-kadheryn oraz czynnika von Willebranda w błonie podstawnej aorty, co skutkowało sztywnieniem tego naczynia (Langlois i wsp., 2017).

W przeprowadzonym doświadczeniu obserwowano również obniżenie ekspresji lamin jądrowych u suplementowanych zwierząt. W wyniku suplementacji diety zarówno 2% inuliny, jak również 4% suszem z korzenia cykorii obserwowano obniżenie ekspresji prelaminy A/C (LMNA). Te charakterystyczne dla osłonki jądrowej filamenty pośrednie są białkami, których ekspresja w komórkach wzrasta w wyniku zmian naprężenia (Lammerding i wsp., 2004). Wykazano zaangażowanie lamin A/C w proces odpowiedzi na stres, spowodowany zmianami ciśnienia krwi w komórkach mięśni gładkich aorty (Malkawi i wsp., 2015). W wyniku indukcji, ekspresja tych białek wzrasta powodując

sztynienie jądra komórkowego, przyspieszając procesy starzenia się komórek mięśni gładkich (Ragnouth i wsp., 2010). Odwrotna tendencja ekspresji tego białka w aortach suplementowanych zwierząt może być zatem odbierana jako efekt korzystnego działania produktów fermentacji inuliny.

W prezentowanym doświadczeniu ponadto, obserwowano obniżenie ekspresji izoformy 3 winkuliny u zwierząt suplementowanych suszem z korzenia cykorii.

Winkulina (VCL) jest białkiem, które czuwa nad spójnością połączeń komórkowych (kadheryn). W trakcie rozwoju naczyń krwionośnych połączenia komórkowe ulegają przekształceniom morfologicznym zarówno *in vivo* i *in vitro*. Morfogenezę interakcji między komórkami związana jest prawdopodobnie z obniżeniem ekspresji winkuliny. Wyniki w prezentowanej pracy identyfikują VCL jako ważny czynnik rozwoju naczyń krwionośnych. Maddugoda i wsp. (2007) podają, że prawdopodobnie winkulina kontroluje proces, w którym wczesne połączenia między komórkami miały charakter nie ciągły, a wraz z rozwojem organizują się jako spójny liniowy kontakt jako dojrzałe połączenia komórkowe. Można identyfikować winkulinę jako część potężnego aparatu molekularnego odpowiedzialnego za powstawanie i generowanie spójnych połączeń komórkowych. Maddugoda i wsp. (2007) postulują że winkulina współpracuje z miozyna IV w celu reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, co umożliwia powstanie spójnych i liniowych połączeń komórkowych (kadherynowych). Analiza piśmiennictwa wskazuje, iż to w jaki sposób winkulina uczestniczy w tym procesie nie zostało jeszcze do końca zdefiniowane na poziomie molekularnym. Jak podają Wang i wsp. (2020) nadekspresja białka winkuliny w stanach patologicznych może przyczyniać się do nieprawidłowej migracji, adhezji i proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń zmieniając je z fenotypu kurczliwego na syntetyczny. Wiadomym jest, że syntetyczne komórki mięśni gładkich naczyń mogą wydzielać zwiększoną ilość metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) co prowadzi do proteolizy elastyny w ścianie aorty. Białka związane z macierzą komórkową pełnią istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy naczyniowej zależnej od fizjologicznej funkcji skurczowej komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Funkcja ta jest ściśle związana z adhezją komórek do macierzy. Zewnątrzkomórkowe sygnały mechaniczne powodowane naporem krwi przekształcane są w wewnątrzkomórkowe sygnały chemiczne, które stabilizują cytoszkielet komórkowy i utrzymują plastyczność naczynia krwionośnego (Kurihara i wsp., 2012; Hu i wsp., 2018)

W prezentowanym doświadczeniu zaobserwowano obniżoną ekspresję białka septyny 8 (SEPT8) w grupie zwierząt, które otrzymywały 4% dodatek suszy z korzenia

cykorii do paszy. Septyny są również obserwowane jako włókna, które łączą się z aktyną, mikrotubulami lub błonami, a zatem są uważane za czwarty składnik cytoszkieletu (Mostowy i Cossart, 2012). Septyny działają jako rusztowania dla oddziaływań białko-białko oraz kontrolują przebudowę aktyny stabilizując to białko podczas migracji komórek wpływając na lamellipodia migrujących komórek (Dolat i wsp., 2014)

Wyniki wskazują na pozytywny wpływ dodatków paszowych zawierających inulinę na architekturę aorty, poprzez regulację białek związanych z przyczepami ogniskowymi błony podstawnej aorty i stabilizację aktyny za pośrednictwem septyny 8 u rosnących prosiąt.

Kolejnym białkiem związanym z rozwojem naczyń krwionośnych zidentyfikowanym w grupie doświadczalnej (2% dodatek inuliny do diety) w prezentowanym doświadczeniu jest aneksyna 2 (ANXA2). Jest to wielofunkcyjne białko stanowiące rusztowanie błonowe w trakcie tworzenia i rozwoju nowych naczyń krwionośnych (Ling i wsp., 2004). Aneksyna 2 wiąże F-aktynę i spektrynę (Gerke i Weber, 1984) i uważa się, że pośredniczy w sygnalizacji między cytoplazmą a błoną plazmatyczną poprzez oddziaływanie z fosfolipidami błonowymi i filamentami aktynowymi (Gerke i Moss, 2002; Rescher i Gerke, 2004). Wykazano, że ANXA2 wpływa na rozwój śródbłonka naczyniowego, a także tworzy kompleksy z E-kadheryną (Lee i wsp., 1999). Obniżone stężenie ANXA2 zmniejsza integralność bariery śródbłonkowej, bowiem wiadomo, że białko to kontroluje morfogenezę śródbłonka (Su i wsp., 2010). W prezentowanym doświadczeniu wzrost ekspresji aneksyny 2 u rosnących prosiąt pod wpływem dodatku 2% inuliny do diety prawdopodobnie wpływa na prawidłowy rozwój naczyń krwionośnych u prosiąt w okresie intensywnego wzrostu.

Suplementacja diety 2% wodnym roztworem inuliny spowodowała obniżenie ekspresji białka 1 związanego z kaweolami (CAVIN-1). Białka kaweoli pełnią kluczową rolę w sygnalizacji komórkowej, regulacji homeostazy lipidów, wspomaganie napięcia naczyniowego oraz regulacji ciśnienia krwi. Wiadomym jest, że białka kaweoli występują licznie w komórkach śródbłonka i uczestniczą w mechanizmie relaksacji naczyń krwionośnych poprzez stymulację wytwarzania tlenu azotu (Chidlow i Sessa, 2010). W szczególności regulacja syntazy tlenu azotu (eNOS) przez kaweolinę-1 (CAV-1) jest ważnym fizjologicznym mechanizmem kontroli reaktywności naczyń. Ponadto wiadomo, że białka te występują we wszystkich innych typach komórek układu sercowo-naczyniowego, w tym naczyniowych komórkach mięśni gładkich (VSMC), makrofagach,

miocytach serca i fibroblastach (Sowa, 2012). Jak podają Fang i wsp. (2007) nadekspresja tych białek powoduje starzenie się komórek poprzez indukcję białka p53. Autorzy wskazują jednocześnie, że nadekspresja tych białek powoduje specyficzny wzrost czynników przeciwzapalnych. Mechanizm tego kompensacyjnego działania jak wskazują autorzy z wyjątkową cechą nadekspresji kaweoli pozostaje wciąż nie jasny. Interesującym jest również fakt, że ekspresja CAVIN-1 jest regulowana poprzez zawartość wolnego cholesterolu w komórkach oraz głównej lipoproteiny osocza bogatej w cholesterol.

Obniżona ekspresja białka CAVIN1 po zastosowaniu diety z 2% dodatkiem inuliny może sugerować o prawidłowości fizjologicznych zmian zachodzących w naczyniach krwionośnych rozwijającego się organizmu. Dodatkowo wskazuję na to fakt stałego stężenia cholesterolu i trójglicerydów stwierdzonego w prezentowanym doświadczeniu.

Zastosowanie diet eksperymentalnych spowodowało również zmiany ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej aorty świń. Przykładem tych zmian może być obniżenie ekspresji łańcucha alfa-1 kolagenu typ VI (COL6A1) w wyniku zastosowania dodatku suszu z korzenia cykorii do diety świń. Z literatury wynika, że aby utrzymać właściwości mechaniczne aorty koniecznym jest zachowanie odpowiedniego stosunku pomiędzy włóknami elastynowymi a kolagenowymi (Tsamis i wsp., 2013). Wraz z wiekiem depozycja kolagenu w aorcie wzrasta, co wpływa na obniżenie jej elastyczności. Można więc stwierdzić, że obniżająca się ekspresja kolagenu typu VI w aorcie świń suplementowanych suszem z korzenia cykorii może wpłynąć na wzrost elastyczności tego naczynia wpływając korzystnie na jego właściwości mechaniczne. W przypadku zwierząt suplementowanych 2% wodnym wyciągiem fruktanów typu inulinowego, zmiany ekspresji kolagenu nie są tak jednoznaczne, gdyż w tej grupie zwierząt obserwowano wzrost ekspresji łańcucha alfa-1 kolagenu typu VI (COL6A1) oraz obniżenie łańcucha alfa-2 kolagenu typu VI (COL6A2). Trudno jest jednak stwierdzić jaki jest powód występowania przeciwstawnych zmian tych białek w grupie zwierząt otrzymującej 2% dodatek inuliny do diety. Obniżenie ekspresji COL6A1 stwierdzono również po podaniu 4% dodatku suszu z korzenia cykorii do diety eksperymentalnej. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji związanych z ekspresją tego białka pod wpływem suplementacji inuliny u zwierząt w okresie wzrastania.

Wiadomo, że kolagen wraz z elastyną są bardzo ważnymi determinantami integralności naczyń krwionośnych. Przypuszcza się że kolagen jest głównym czynnikiem wpływającym na wytrzymałość i elastyczność aorty. W okresie zarodkowym i rozwojowym kolagen typu VI jest włóknistym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. W tym okresie odgrywa on bardzo ważną rolę w organizacji struktury macierzy oraz pośredniczy w interakcjach pomiędzy komórką a macierzą jako czynnik biologiczny (Dziadek i wsp., 1996). Ponadto wykazano, że kolagen typu VI odgrywa kluczową rolę w proliferacji i funkcjonowaniu komórek śródbłonna (Madri, 1997). Dodatek do diety 2% inuliny, który spowodował wzrost ekspresji łańcucha alfa 1 kolagenu (typ VI), prawdopodobnie związany jest z rozwojem naczyń krwionośnych bowiem sprzyja temu właściwa synteza białek kolagenu.

W doświadczeniu wykazano również wpływ suplementacji diety suszem z korzenia cykorii na obniżenie ekspresji fibuliny-3 (EFEMP1) glikoproteiny związanej z macierzą zewnątrzkomórkową. Wykazano, że wzrost ekspresji tego białka indukowany jest w wyniku nadciśnienia tętniczego u szczurów (Chen i wsp., 2019). Sugeruje się, że wzrost ekspresji tego białka związany jest z remodellingiem macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez inhibicyjny wpływ na metaloproteinazy MMP-2/9, a także poprzez wyciszenie stymulowanego wysokim ciśnieniem stresu oksydacyjnego (Lin i wsp., 2016). Niska ekspresja tego białka wydaje się świadczyć o braku niepożądanych zmian w aorcie suplementowanych zwierząt. Jak sugerują wyżej wymienieni autorzy, zmiany ekspresji EFEMP1 mogą indukować naczyniową zmianę strukturalną ściany aorty, co w konsekwencji prowadzi do przebudowy naczyń ale tylko w przypadku występowania nadciśnienia tętniczego. Ponieważ obniżenie poziomu fibuliny 3 jest ważnym aspektem w leczeniu patogenezy nadciśnienia tętniczego, można dyskutować nad rolą fruktanów typu inulinowego jako naturalnie występujących statyn wspomagających w utrzymaniu prawidłowych wartości ciśnienia krwi na obwodzie. Fakt ten staje się otwartym polem do dyskusji w dalszych badaniach nad wpływem fruktanów typu inulinowego na fizjologię naczyń krwionośnych rosnącego organizmu.

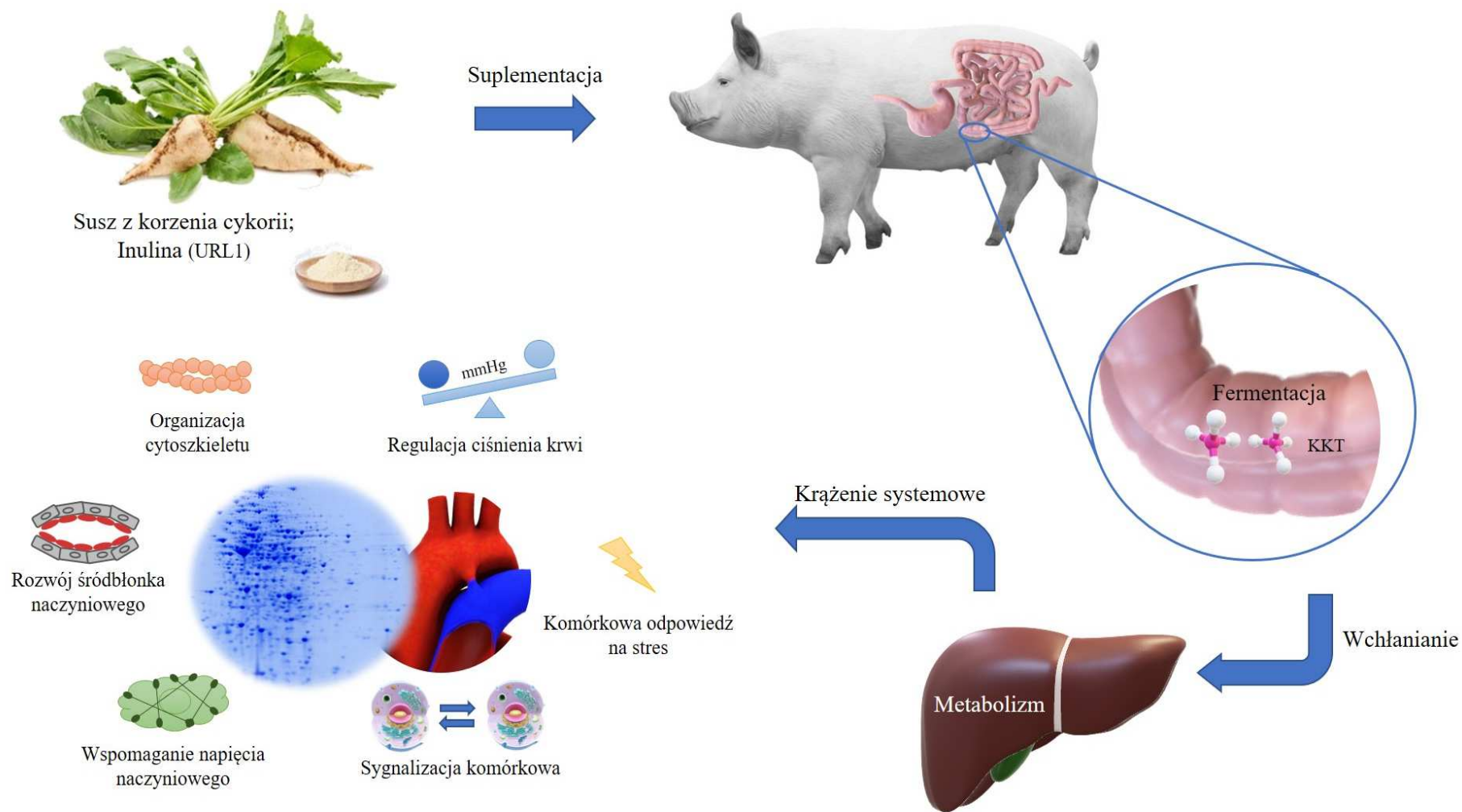
W przeprowadzonym doświadczeniu nie wykazano istotnego wpływu zastosowania w diecie fruktanów typu inulinowego oraz bogatego w nie suszu z korzenia cykorii na koncentrację cholesterolu całkowitego (TC) oraz trójglicerydów (TG) w tkance aortalnej prosiąt. W przeprowadzonych na tej samej stawce zwierząt badaniach wykazano, wzrost syntezy cholesterolu i trójglicerydów w wątrobie prosiąt żywionych obiema dietami eksperymentalnymi, jednak wartości dla tych wskaźników pozostawały

w zakresie wartości referencyjnych dla świń (Lepczyński i wsp., 2021). Ten efekt suplementacji diety świń inuliną oraz suszem z korzenia cykorii nie znalazł odzwierciedlenia zarówno w stężeniu TC oraz TG w osoczu krwi prosiąt w którym stężenie cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji było zbliżone u zwierząt żywionych dietą kontrolną oraz obiema dietami eksperymentalnymi, w przypadku stężenia trójglicerydów wykazano zaś ich istotne obniżenie w grupie zwierząt żywionych suszem z korzenia cykorii (Lepczyński i wsp., 2015; Herosimczyk i wsp., 2015). Zastosowanie suplementacji 2% inuliną oraz 4% suszu z korzenia cykorii nie wpłynęło również na stężenie zarówno cholesterolu, jak i trójglicerydów w niezwykle aktywnych metabolicznie narządach jakim są nerki prosiąt (Lepczyński i wsp., 2021). Można więc założyć, że zbliżone wartości stężeń TC oraz TG w aorcie rosnących prosiąt, są odzwierciedleniem ich stężenia w osoczu krwi tych zwierząt. Co mogą potwierdzać badania Stender i Hjelms (1984) wskazujące na to, iż wzrost osoczowego stężenia cholesterolu ma wpływ na jego depozycję w aorcie człowieka.

7. Podsumowanie

Podsumowując, wyniki badań przedstawiają kompleksowy przegląd proteomiczny aorty u rosnących prosiąt (mapa aorty 407-426 spotów białkowych w tym 179 białek zidentyfikowanych z wykorzystaniem spektrometrii masowej typu MALDI-ToF), oraz identyfikację różnic w profilach białkowych w zależności o podanej diety. Proteomiczne profilowanie aorty u rosnących prosiąt jest pierwszym doświadczeniem, w którym badany był wpływ diety inulinowej poprzez wykorzystanie elektroforezy dwukierunkowej (2DE) oraz spektrometrii masowej typu MALDI – ToF i zidentyfikowanie 26 białek. W szczególności wyniki badań wskazują, że suplementacja fruktanami typu inulinowego może zmieniać ekspresję wielu białek w tej tkance u rosnących prosiąt. Ciekawym jest, że zastosowane warunki żywieniowe w doświadczeniu (2% wodny wyciąg inuliny i 4% susz z korzenia cykorii) miały wpływ na zmiany ekspresji tych samych białek (alfa 1 kwaśna glikoproteina, izoforma 3 retikulokalbiny 2, białko szoku cieplnego o masie 71 kDa, prelamina A/C, podjednostka alfa białka 1 kompleksu T) co sugeruje rolę inuliny w modulowaniu ich ekspresji. W aorcie dwoma ważnymi skutkami podaży inuliny wydają być się zmiany w procesach związanych z cytoszkieletem takich jak: funkcja i utrzymanie komórki, składanie, organizacja i ruch. Wpływ tych zmian na funkcje naczyniowe nie jest jeszcze do końca poznany. Ale wiadomym jest jednak że pełnią ważne istotnie role na różnych etapach wzrostu oraz rozwoju naczyń i wiązane są z angiogenezą i homeostazą naczyniową. Drugim istotnym skutkiem działania inuliny wydają się być białka zaangażowane w komórkową odpowiedź na stres (białko szoku cieplnego A8, prekursor kalretikuliny, białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3) oraz białka stanowiące rusztowanie błonowe w trakcie tworzenia i rozwoju naczyń krwionośnych. Ciekawym jest również fakt, że suplementacja diety fruktanami typu inulinowego wywołała zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w mechanizmy regulujące ciśnienie krwi oraz wspomaganie napięcia naczyniowego w aorcie u młodych rosnących prosiąt, jak również na rozwój śródbłonna naczyniowego w tym kluczową rolę w sygnalizacji komórkowej rys. 16.

Rysunek 16. Wpływ suplementacji diety inuliną i/lub suszem z korzenia cykorii na zmiany proteomu aorty rosnących prosiąt. Skróty: KKT – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe.



8. Wnioski

1. Uzyskane z wykorzystaniem elektroforezy 2DE i spektrometrii masowej typu MALDI-ToF powtarzalne profile proteomiczne (mapy białkowe) aorty rosnących prosiąt mogą stanowić istotne tło dla różnicowania zmian ekspresji i identyfikacji białek pod wpływem działania czynnika doświadczalnego w fizjologii i patofizjologii tego naczynia.
2. Suplementacja diety fruktanami typu inulinowego nie wpłynęła na depozycję cholesterolu i trójglicerydów w tętnicy głównej u rosnących prosiąt.
3. Suplementacja diety wodnym wyciągiem inuliny oraz suszem z korzenia cykorii powodują istotne zmiany sygnatury ekspresji białek w aorcie u rosnących świń.
4. Suplementacja diety fruktanami typu inulinowego wpływa na zmiany ekspresji białek zaangażowanych w komórkową odpowiedź na stres (TXNDC5, CALR, TCP1, PDIA3, HSPA8), co wskazuje na możliwość ochrony antyoksydacyjnej aorty poprzez zastosowanie tego dodatku w żywieniu rosnących prosiąt.
5. Suplementacja diety wodnym wyciągiem inuliny oraz suszem z korzenia cykorii spowodowała zmiany ekspresji białek zaangażowanych w organizację cytoszkieletu komórek aorty (VIM, VCL, ACTR3).
6. Suplementacja diety rosnących prosiąt, fruktanami typu inulinowego wywołała pozytywne zmiany w ekspresji białek w aorcie, zaangażowanych w mechanizmy regulujące ciśnienie krwi (RCN2, ORM1, TXNDC5), wspomaganie napięcia naczyniowego (EFEMP1) oraz rozwój śródbłonna naczyniowego (ANXA2), w tym kluczową rolę w sygnalizacji komórkowej (VIM, CAVIN1).

9. Bibliografia

1. Alexiou H., Franck A.: Prebiotic inulin-type fructans: nutritional benefits beyond dietary fibre source. *Nutrition Bulletin*, 2008, 33, s. 227-233
2. Anderson J.W., Hanna T.J.: Impact of nondegistible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129 (7 Suppl), s. 1457S1466S
3. Antfolk D., Sjoqvist M., Cheng F., Isoniemi K., Duran C.L., Rivero-Muller A., Antila C., Niemi R., Landor S., Bouten C.V.C., Bayless K.J., Eriksson J.E., Sahlgren C.M.: Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 2017, 114(23), s. e4574-4581
4. Arab S., Gramolini A.O., Ping P., Kislinger T., Stanle B., van Eyk J., Ouzounian M., MacLennan D.H., Emili A., Liu P.P.: Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 48(9), s. 1733-1741
5. Bałczewska D., Ptaszyński P., Cygankiewicz I.: Odruch z baroreceptorów tętnicznych: metody oceny i zastosowanie kliniczne. *Przegląd lekarski*, 2015, 72(11), s. 682-689
6. Barre-Sinoussi F., Montagutelli X.: Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA*, 2015, 1(4), s. FSO63
7. Barszcz M., Taciak M., Skomiał J.: Influence of different inclusion levels and chain length of inulin on microbial ecology and the state of mucosal protective barrier in the large intestine of young pigs. *Animal Production Science* 58(6)
8. Bassols A., Costa C., Eckersall P.D., Osad J., Sabria J., Tibau J.: The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics in Clinical Applications*, 2014, 8(9-10), s. 715-731
9. Bedarida T., Domingues A., Baron S., Ferreira C., Vibert F., Cottart C-H., Paul J-L., Escriou V., Bigey P., Gaussem P., Leguillier T., Nivet-Antoine V.: Reduced endothelial thioredoxin-interacting protein protects arteries from damage induced by metabolic stress in vivo. *FASEB Journal*, 2018, 32(6), s. 3108-3118
10. Bendixen E., Danielsen M., Hollung K., Gianazza E., Miller I.: Farm animal proteomics – a review. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(3), s. 282-293

11. Bendixen E., Danielsen M., Larsen K., Bendixen C. Advances in porcine genomics and proteomics- a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Briefings in Functional Genomics*, 2010, 9(3), s. 208-219
12. Bendixen E.: Animal models for transational proteomics. *Proteomics. Clinical Applications*, 2014, 8(9-10), s. 637-639
13. Bendixen E.: The use of proteomics in meat science. *Meat science*, 2005, 71(1), s. 138-149
14. Bernadskaya Y.Y., Patel F.B., Hsu H-T., Soto M.C.: Arp2/3 promotes junction formation and maintenance in the *Caenorhabditis elegans* intestine by regulating membrane association of apical proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(16), 2886-2899
15. Biwer L., Straub A., Isakson B.: Subcellular enrichment of calreticulin at myoendothelial junctions (664.2). *The FASEB Journal*, 2014, 28(S1), doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.664.2
16. Biwer L.A., Askew-Page H.A., Hong K., Milstein J., Johnstone S.R., Macal E., Good M.E., Bagher P., Sonkusare S.K., Isakson B.E.: Endothelial calreticulin deletion impairs endothelial function in aged mice. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 2020, 318(5), s. H1041-H1048
17. Biwer L.A., Good M.E., Hong K., Patel R.K., Agrawal N., Looft-Wilson R., Sonkusare S.K., Isakson B.E.: Non-endoplasmic reticulum-based Calr (calreticulin) can coordinate heterocellular calcium signaling and vascular function. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2018, 38(1), s. 120-130
18. Boccardi C., Cechettini A., Caselli A., Camici G., Evangelista M., Mercatanti A., Rainaldi G., Citti L.: A proteomic approach to the investigation of early events involved in vascular smooth muscle cel activation. *Cell and tissue research*, 2007, 328(1), s. 185-195
19. Bouley J., Chambon C., Picard B.: Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2004, 4(6), s. 1811-1824
20. Canfora E.E., Jocken J.W., Blaak E.E.: Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11(10), s. 577-591

21. Carpintero R., Alonso C., Pineiro M., Iturralde M., Andres M., Le Potier M-F., Madec F., Alva M.A., Pineiro A., Lampreave F.: Pig Major Acute-Phase Protein an apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Veterinary Research*, 2007, 38(5), s. 741-753
22. Catry E., Bindels L.B., Tailleux A., Lestavel S., Neyrinck A.M., Goossens J-F., Lobysheva I., Plovier H., Essaghir A., Demoulin J-B., Bouzin C., Pachikan B.D., Cani P.D., Staels B., Dessy C., Delzenne N.M.: Targeting the gut microbiota with inulin-type fructans: preclinical demonstration of a novel approach in the management of endothelial dysfunction. *Gut*, 2018, 67(2), s. 271-283
23. Chang Y-X., Lin Y-F., Chen C-L., Huang M-S., Hsiao M., Liang P-H.: Chaperonin-containing TCP-1 promotes cancer chemoresistance and metastasis through the AKT-GSK3 β - β -catenin and XIAP-survivin pathways. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12), 3865
24. Chang Z., Yan G., Yan H., Zheng J., Liu Z.: Reticulocalbin 2 enhances osteogenic differentiation of human vascular smooth muscle cells in diabetic conditions. *Life science*, 2019, 233, s. 116746
25. Chen J-M., Guo R-R., Gao Y., Wang C-X., Yuan P-N.: Mechanism of action of Profilin-1 and Fibulin-3 in vascular remodeling in hypertensive rats. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2019, 23(18), s. 8108-8108
26. Chidlow J.H., Sessa W.C.: Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signaling and inflammation. *Cardiovascular research*, 2010, 86(2), 219-225
27. Cieřlik E., Gębusia A.: Żywność funkcjonalna z dodatkiem fruktanów. *Żywność.Nauka.Technologia.Jakość*, 2011, 2(75), s. 27-37
28. Corbett J.M., Wheeler C.H., Baker C.S., Yacoub M.H., Dunn M.J.: The human myocardial two-dimensional gel protein database: update 1994. *Electrophoresis*, 1994, 15(11), s. 1459-1465
29. Correia-Sa I., de-Sousa-Lopes H., Martins M.J., Azevedo I., Moura E., Vieira-Coelho M.A.: Effects of raftilose on serum biochemistry and liver morphology in rats fed with normal or high-fat diet. *Molecular nutrition & food research*, 2013, 57(8), s. 1486-1472

30. D'Ambrosio C., Arena S., Talamo F., Ledda L., Renzone G., Ferrara L., Scaloni A.: Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids: bovine proteome database. *Journal of chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005, 815, s. 157-168
31. Dave J.M., Bayless K.J.: Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*, 2014, 21(4), s. 333-344
32. Davidson M.H., Maki K.C., Synecki C., Torri S.A., Drennan K.B.: Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutrition Research*, 1998, 18(3), s. 503-517
33. de Almeida A.M., Bendixen E.: Pig proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(14), s. 4296-4314
34. de Jong R., Leoni G., Drechsler M., Soehnlein O.: The advantageous role of annexin A1 in cardiovascular disease. *Cell adhesion and migration*, 2017, 11(4), s. 261-274
35. DeAgüero J.L., McKown E.N., Zhang L., Keirse J., Fischer E.G., Samedi V.G., Canan B.D., Kilic A., Janssen P.M., Delfin D.A.: Altered protein levels in the isolated extracellular matrix of failing human hearts with dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular pathology*, 2017, 26, s. 12-20
36. Delzenne N.M., Kok N., Fiordaliso M-F., Deboyser D.M., Goethals F.M., Roberfroid M.B.: Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, 57(5), s. 820S
37. Delzenne N.M., Kok N.: Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *The American Journal of clinical nutrition*, 2001, 73(2 Suppl), s. 456S/458S
38. Demigné C., Morand C., Levrat M-A., Besson C., Moundras C., Rémésy C.: Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition*, 1995, 74, s. 209-219
39. Diao H., Jiao A.R., Yu B., He J., Yu J., Zheng Z.Q., Luo J.Q., Mao X.B., Chen D.W.: Stimulation of intestinal growth with distal ileal infusion of short-chain fatty acid: A reevaluation in a pig model. *RSC Advances*, 2017, 7(49), 30792-30806

40. Diao H., Jiao A.R., Yu B., Mao X.B., Chen D.W.: Gastric infusion of short-chain fatty acids improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes and Nutrition*, 2019, 14(4), s. 1-16
41. Dinardo C.L., Venturini G., Zhou E.H., Watanabe I.S., Campos L.C.G., Dariolli R., da Motta-Leal-Filho J.M., Carvalho V.M., Cardozo K.H.M., Krieger J.E., Alencar A.M., Pereira A.C.: Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSCM along the arterial tree. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 2014, 306(4), s. H505-516
42. Dobrin P.B., Baker W.H., Gley W.C.: Elastolytic and collagenolytic studies on arteries. *Archives of Surgery*, 1984, 119(4), s. 405-409
43. Dobrin P.B., Mrvicka R.: Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovascular Surgery*, 1994, s. 484-488
44. Dolat L., Hunyara J.L., Bowen J.R., Karasmanis E.P., Elgawly M., Galkin V.E., Spiliotis E.T.: Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *Journal of Cell Biology*, 2014, 207(2), s. 225-235
45. Domingues A., Boisson-Vidal C., de Rouge P.M., Dizier B., Sadoine J., Mignon V., Vessieres E., Henrion D., Escriou V., Bigey P., Chaussain C., Smadja D.M., Nivet-Antoine V.: Targeting endothelial thioredoxin-interacting protein (TXNIP) protects from metabolic disorder-related impairment of vascular function and post-ischemic revascularisation. *Angiogenesis*, 2020, 23(2), s. 249-264
46. Donners M.M.P.C., Verluyten M.J., Bouwman F.G., Mariman E.C.M., Devereese B., Vanrobaeys F., van Beeuman J., van den Akker L.H.J.M., Daeman M.J.A.P., Heeneman S.: Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression. *The Journal of Pathology*, 2005, 206(1), s. 39-45
47. dos Santos G., Rogel M.R., Baker M.A., Troken J.R., Urich D., Morales-Nebreda L., Sennello J.A., Kutuzov M.A., Sitikov A., Davis J.M., Lam A.P., Cheres P., Kamp D., Shumaker D.K., Budinger G.R.S., Ridge K.M.: Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature communications*, 2015, 6, s. 6574

48. Dubin A., Władyka B.: Fragmentacja białek – mapy peptydowe. Rozdział 8 [W]: Wprowadzenie do chemii białek. Wydział Biotechnologii UJ, Kraków, 2003
49. Dupont A., Corseaux D., Dekeyzer O., Drobecq H., Guihot A-L., Susen S., Vincentelli A., Amouyel P., Jude B., Pincet F.: The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics*, 2005, 5, s. 585-596
50. Dziadek M., Darling P., Bakker M., Overall M., Zhang R.Z., Pan T.C., Tillet E., Timpl R., Chu M.L.: Deposition of collagenVI in the extracellular matrix during mouse embryogenesis correlates with expression of the alpha 3(VI) subunit gene. *Experimental cell research*, 1996, 226(2), s. 302-315
51. Dziągiel N., Szczurek P., Jura J., Pieszka M.: Świnia jako zwierzę modelowe w translacyjnych badaniach biomedycznych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2018, 72, s. 1032-1042
52. Fakuda T., Oyamada H., Isshiki T., Maeda M., Kusakabe T., Hozumi A., Yamaguchi T., Igarashi T., Hasegawa H., Seidoh T., Suzuki T.: Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. *The Journal of histochemistry and cytochemistry*, 2007, 55(4), s. 335-345
53. Fang K., Fu W., Beardsley A.R., Sun X., Lisanti M.P., Liu J.: Overexpression of caveolin-1 inhibits endothelial cell proliferation by arresting the cell cycle at G0/G1 phase. *Cell cycle*, 2007, 6(2), s. 199-204
54. Farmakis D., Papingiotis G., Parissis J., Filippatos G.: Ups and downs in heart failure: the case of proteomics. *European Journal of Heart Failure*, 2018, 20, s. 63-66
55. Faury G., Garnier S., Weiss A.S., Wallach J., Fulop T. Jacob M.P., Mecham R.P., Robert L., Verdetti J.: Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circulation Research*, 1998, 82, s. 328-336
56. Fava F., Tuohy K.M.: Inulin regulates endothelial function: a prebiotic smoking gun?, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 14, s. 392-394
57. Fiordaliso M., Kok N., Desager J.P., Goethals F., Deboyser D., Roberfroid M., Delzenne N.: Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids*, 1995, 30(2), s. 163-167

58. Freeman L.A., Young P.M., Foley T.A., Williamson E.E., Bruce C.J., Greason K.L.: CT and MRI assessment of the aortic root and ascending aorta. *American Journal of roentgenology*, 2013, 200(6), s. W581-592
59. Fu Z., Wang M., Everett A., Lakatta E., Van Eyk J.: Can proteomics yield insight into aging aorta? *Proteomics. Clinical applications*, 2013, 7(7-8), s. 477-489
60. Gałązka I., Klewicki R., Grzelak K.: Hydroliza fruktanów w warunkach stymulujących działanie soku żołądkowego. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2004, 3(40), s. 68-76
61. Gałązka I.: The composition of chicory flour of selected chicory cultivars Polanowicka and Fredonia in relations to root sizes and date of harvest. *Food Science Technology Quality*, 2002, 3, s. 37-45
62. Gerke V., Moss S.E.: Annexins: from structure to function. *Physiological reviews*, 2002, 82(2), s. 331-371
63. Gerke V., Weber K.: Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *The EMBO Journal*, 1984, 3(1), s. 227-233
64. Gold L.I., Rahman M., Blechman K.M., Greives M.R., Churgin S., Michaels J., Callaghan M.J., Cardwell N.L., Pollins A.C., Michalak M., Siebert J.W., Levine J.P., Gurtner G.C., Nanney L.B., Galiano R.D., Cadacio C.L.: Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *The Journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, 2006, 11(1), s. 57-65
65. Gondek M., Herosimczyk A., Knysz P., Ożgo M., Lepczyński A., Szkucik K.: Comparative Proteomic Analysis of Serum from Pigs Experimentally Infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis*. *Pathogens*, 2020, 9(1), s. 1-28
66. Gourineni V.P., Verghese M., Boateng J., Shackelford L., Bhat N.K., Walker L.T.: Combinational effects of prebiotics and soybean against azoxymethane-induced colon cancer in vivo. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2011, 868197, doi: [10.1155/2011/868197](https://doi.org/10.1155/2011/868197)
67. Górnicka J.: Co należy wiedzieć o układzie krążenia u sercu? [W]: *Choroby układu krążenia*. Agencja Wydawnicza Mostowski, 2013, s. 9-10

68. Gramza-Michałowska A., Górecka D.: Wykorzystanie inuliny jako dodatku funkcjonalnego w technologii produkcji potraw. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2009, 3, s. 324-328
69. Grela E.R., Sobolewska S., Roziński T.: Effect of inulin extracts or inulin – containing plant supplement on blood lipid indices and fatty acid profile in fattener tissues. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2014, 17(1), s. 93-98
70. Gun G., Kues W.A.: Current Progress of Genetically Engineered Pig Models for Biomedical Research. *BioResearch Open Access*, 2014, 3(6), s. 255-264
71. Gupta M., Sodhi L., Sahini D.: The branching pattern of internal thoracic artery on the anterior chest wall. *Journal of the anatomical Society of India*, 2002, 51(2), s. 194-197
72. Gutierrez A.M., Nobauer K., Soler L., Razzazi-Fazeli E., Gemeiner M., Ceron J.J., Miller I.: Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: A pilot study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 151(1-2), s. 73-82
73. Hale J.E.: Advantageous uses of mass spectrometry for the quantification of proteins. *International Journal of Proteomics*, 2013, ID 219452, s. 1-6
74. Han H-H., Tsuchihira H., Nakamura Y., Shimada K-I., Ohba K., Aritsuka T., Uchino H., Kikuchi H., Fukushima M.: Inulin-type fructans with different degrees of polymerization improve lipid metabolism but not glucose metabolism in rats fed a high-fat diet under energy restriction. *Digestive diseases and sciences*, 2013, 58(8), s. 2177-2186
75. Hansen C.F., Hernandez A., Mansfield J., Hidalgo A., La T., Phillips N.D., Hampson D.J., Pluske J.R.: A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. *The British journal of nutrition*, 2011, 106(10), 1506-1513
76. Hara H., Haga S., Aoyama Y., Kiriya S.: Short-Chain Fatty Acids Suppress Cholesterol Synthesis in Rat Liver and Intestine. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129(5), s. 942-948
77. Hayhoe R.P.G., Kamal A.M., Solito E., Flower R.J., Cooper D., Perretti M.: Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil – endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood*, 2006, 107(5), s. 2123-2130

78. Herosimczyk A., Dejeans N., Sayd T., Ożgo M., Skrzypczak W.F., Mazur A.: Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, 57(7), s. 81-93
79. Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Barszcz M., Jaszczuk-Kubiak E., Pierzchała M., Tuśnio A., Skomiał J.: Hepatic proteome changes induced by dietary supplementation with two levels of native chicory inulin in young pigs. *Livestock Science*, 2017, 203, s. 54-62
80. Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Barszcz M., Marynowska M., Tuśnio A., Taciak M., Markulen A., Skomiał J.: Proteome changes in ileal mucosa of young pigs resulting from different levels of native chicory inulin in the diet. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2018, 27, s. 229-237
81. Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Dratwa-Chałupnik A., Skomiał J., Tuśnio A., Taciak M., Barszcz M.: Differentially expressed proteins in the blood serum of piglets in response to a diet supplemented with inulin. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2015, 18(3), s. 541-548
82. Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Skomiał J., Dratwa-Chałupnik A., Tuśnio A., Taciak M., Barszcz M.: Differentially expressed proteins in the blood serum of in response to a diet supplemented with inulin. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2015, 18(3), 541-548
83. Herosimczyk A., Ożgo M., Skrzypczak W.F., Lepczyński A., Polak A., Kinert N.: Miocardial and pericardial 2-De protein profiles of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Medycyna Weterynaryjna*, 2015, 71(9), s. 557-562
84. Hinek A.: Biological roles of the non-integrin/laminin receptor. *Biological Chemistry*, 1996, 377, s. 471-480
85. Hocquette J.F., Bernard C., Cassar-Malek I., Lepetit J., Micol D., Jurie C., Meunier B., Renard G., Picard B.: Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, 2007, 1(1), s. 159-173
86. Hu Y., Lu L., Qiu Z., Huang Q., Chen Y., Chen L.: Mechanical stretch aggravates aortic dissection by regulating MAPK pathway and the expression of MMP-9 and inflammation factors. *Biomedecine&Pharmacotherapie*, 2018, 108, s. 1294-1302
87. Huang S.Y., Tam M.F., Hsu Y.T., Lin J.H., Chen H.H., Chuang C.K., Chen M.Y., King Y.T., Lee W.C.: Developmental changes of heat-shock protein in

- porcine testis by a proteomic analysis. *Theriogenology*, 2005, 64(9), s. 1940-1955
88. Husi H., van Agmael T., Mullen W., Bahlmann F.H., Schanstra J.P., Vlahou A., Delles C., Perco P., Mischak H.: Proteome-based systems biology analysis of the diabetic mouse aorta reveals major changes in fatty acid biosynthesis as potential hallmark in diabetes mellitus – associated vascular disease. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 2014, 7(2), s. 161-70
89. Hyder C.L., Isoniemi K.O., Torvaldson E.S., Eriksson J.E.: Insights into intermediate filament regulation from development to aging. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 9), s. 1363-1372
90. Ichii T., Koyama H., Tanaka S., Kim S., Shioi A., Okuno Y, Raines E.W., Iwao H., Otani S., Nishizawa Y.: Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes involved in cellular responses and the pericellular matrix environment. *Circulation Research*, 2001, 88, s. 460-467
91. Ivaska J., Pallari H-M., Nevo J., Eriksson J.E.: Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(10), s. 2050-2062
92. Ivaska J., Vuoriluoto K., Huovinen T., Izawa I., Inagaki M., Parker P.J.: PKCepsilon – mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility, 2005, 24(22), s. 3834-3845
93. Ix, J.H., Katz R., de Boer I.H., Kestenbaum B.R., Peralta C.A., Jenny N.S., Budoff M., Allison M.A., Criqui M.H., Siscovick D., Shlipak M.G.: Fetuin-A is inversely associated with coronary artery calcification in community – living persons: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Clinical Chemistry*, 2012, 58(8), s. 887-895
94. Jarvis S., Saman S.: Cardiac system 1: Anatomy and Physiology. *Nursing Times*, 2018, 114(2), s. 34-37
95. Jarvis S.: Vascular system 1: Anatomy and Physiology. *Nursing Times*, 2018, 114(4), s. 40-44
96. Jędrzejczak-Krzepkowska M., Bielecki S.: Bifidobakterie i stymulujące ich wzrost fruktany typu inuliny. *Postępy Biochemii*. 2011; 57(4): 392-400
97. Jiao A.R., Diao H., Yu B., He J., Yu J., Zheng P., Huang Z.Q., Luo Y.H., Luo J.Q., Mao X.B., Chen D.W.: Oral administration of short chain fatty acids could attenuate fat deposition of pigs. *PLoS ONE*, 2018, 13(5), s. 1-12

98. Jiu Y., Lehtimäki J., Tojkander S., Cheng F., Jaalinoja H., Liu X., Varjosalo M., Eriksson J.E., Lappalainen P.: Bidirectional interplay between vimentin intermediate filaments and contractile actin stress fibers. *Cell reports*, 2015, 11(10), s. 1511-1158
99. Judžentienė A., Budiene J.: Volatile constituent from aerial parts and roots of *Cichorium intybus* L. (chicory) grown in Lithuania. *Chemija*, 2008, 19(2), s. 25-28
100. Jungblut P., Otto A., Zeindl-Eberhart E., Knecht M., Regitz-Zagrosek V., Fleck E., Wittmann-Liebold B.: Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. *Electrophoresis*, 1994, 15(5), s. 685-707
101. Kaga E., Karademir B., Baykal A.T., Ozer N.K.: Identification of differentially expressed proteins in atherosclerotic aorta and effect of vitamin E. *Journal of Proteomics*, 2013, 92, s. 260-273
102. Kamińska H., Podbielska H.: The identification of proteins by Peptide Mass Fingerprinting (PMF), Part I – properties of the identification experiment. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, 2011, 2(17), s. 153-160
103. Kaur N., Gupta A.K.: Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 2002, 27(7), s. 703-14
104. Kim M., Shin H.K.: The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentration, cecal short-chain fatty acid concentration and fecal lipid excretion in rats. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(10), 1731-1736
105. Kim M.: The water-soluble extract of chicory reduces cholesterol uptake in gut-perfused rats. *Nutrition Research*, 2000, 20(7), s. 1017-1026
106. Kim N.K., Joh J.H., Park H.R., Kim O.H., Park B.Y., Lee C.S.: Differential expression profiling of the proteomes and their mRNAs in porcine white and red skeletal muscles. *Proteomics*, 2004, 4, s. 3422-3428
107. Knecht M., Regitz-Zagrosek V., Pleissner K.P., Emig S., Jungblut P., Hildebrandt A., Fleck E.: Dilated cardiomyopathy: computer – assisted analysis of endomyocardial biopsy protein patterns by two-dimensional gel electrophoresis. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 1994, 32(8), s. 615-624
108. Knusters D.H.M., Chatrou M.L., Willems B.A.G., De Saint-Hubert M., Bauwens M., van der Vorst E., Bena S., Biessen E.A.L., Perretti M., Schurgers

- L.J., Reutelingsperger C.P.M.: Pharmacological Treatment with Annexin A1 Reduces Atherosclerotic Plaque Burden in LDLR ^{-/-} Mice on Western Type Diet. *PloS One*, 2015, 10(6), s. e0130484
109. Kotunia A., Pietrzak P., Guilloteau P., Zabielski R.: Kwas masłowy w przewodzie pokarmowym. *Przegląd gastroenterologiczny*, 2010, 5(3), s. 117-122
110. Kowalski R., Wierciński J.: Ocena niektórych gatunków *Silphium* jako surowców inulinowych. *Annales UMCS Sec E*, 2004, 59(1), s.189-195
111. Kulczyński B., Gramza-Michałowska A.: Właściwości prozdrowotne fruktanów typu inuliny. *Medycyna Rodzinna*, 2016, 19(2), s. 86-90
112. Kurihara T., Shimizu-Hirota R., Shimoda M., Adachi T., Shimizu H., Weiss S.J., Itoh H., Hori S., Aikawa N., Okada Y.: Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation*, 2012, 126(25), s. 3070-3078
113. Kuzmuk K.N., Schook L.B.: Pigs as a model for biomedical sciences. [W]: *The genetics of the pig*. Wyd. II, Wallingford UK, 2011, s. 426-438
114. Kwak H-I., Kang H., Dave J.M., Mendoza E.A., Su S-C., Maxwell S.A., Bayless K.J.: Calpin-mediated vimentin cleavage occurs upstream of MT1-MMP membranę translocation to facilitate endothelial sprout initiation. *Angiogenesis*, 2012, 15(2), 287-303
115. Labat-Robert J., Robert L.: Interaction between cells and extracellular matrix: signaling by integrins and the elastin-laminin receptor. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2000, 25, s. 57-70
116. Lamers R-JAN., Van de Sandt J.J.M., Venema K., Schaafsma G., Van der Greef J., Van Nesselrooij J.H.J., Wessels E.C.H.H.: A pilot study to investigate effects of inulin on Caco-2 cells through in vitro metabolic fingerprinting. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(10), s. 3080-3084
117. Lametsch R., Bendixen E.: Proteome analysis applied to meat science: characterizing postmortem changes in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, s. 4531-4537
118. Lammerding J., Schulze P.C., Takahashi T., Kozlov S., Sullivan T., Kamm R.D., Stewart C.L., Lee R.T.: Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(3), s. 370-378

119. Langlois B., Belozertseva E., Parlakian A., Bourhim M., Gao-Li J., Blanc J., Tian L., Coletti D., Labat C., Ramdame-Cherif Z., Challande P., Regnault V., Lacolley P., Li Z.: Vimentin knockout results in increased expression of sub-endothelial basement membrane components and carotid stiffness in mice. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 11628
120. Lau E. O-C., Lo C-Y., Yao Y., Mak A., F-T., Jiang L., Huang Y., Yao X.: Aortic baroreceptors display higher mechanosensitivity than carotid baroreceptors. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7(384), s. 1-8
121. Lech C., Swaminathan A.: Abdominal Aortic Emergencies. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 2017, 35(4), s. 847-867
122. Lee C-K., Kim H.J., Lee Y.R., So H.H., Park H-J., Won K-J., Park T., Lee K-Y., Lee H.M., Kim B.: Analysis of peroxiredoxin decreasing oxidative stress in hypertensive aortic smooth muscle. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1774(7), s. 848-855
123. Lee O.H., Kim Y.M., Lee Y.M., Moon E.J., Lee D.J., Kim J.H., Kim K.W., Kwon Y.G.: Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 264(3), s. 743-750
124. Lepczyński A., Herosimczyk A., Ozgo M., Skomiał J., Taciak M., Barszcz M., Berezicka N.: Dietary supplementation with dried chicory root triggers changes in the blood serum proteins engaged in the clotting proces and the innate immune response in growing pigs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2015, 66(1), s. 47-55
125. Lepczyński A., Herosimczyk A., Barszcz M., Ożgo M., Michałek K., Grabowska M., Tuśnio A., Szczerbińska D., Skomiał J.: Diet supplemented either with dried chicory root or chicory inulin significantly influence kidney and liver mineral content and antioxidative capacity in growing pigs. *Animal*, 2021, 15(2), 100129
126. Lepczyński A., Herosimczyk A., Ożgo M., Barszcz M., Taciak M., Skomiał J.: Modyfication of ileal proteome in growing pigs by dietary supplementation with inulin or dried chicory root. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2019, 28, s. 177-186

127. Lepczyński A., Herosimczyk A., Ożgo M., Bereżecka N., Skomiał J., Taciak M., Barszcz M.: Dietary supplementation with dried chicory root triggers in the blood serum proteins engaged in the clotting proces and the innate immune response in growing pigs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2015, 66(1), 47-55
128. Lepczyński A., Herosimczyk A., Ożgo M., Marynowska M., Pawlikowska M., Barszcz M., Taciak M., Skomiał J.: Dietary chicory root and chicory inulin trigger changes in energetic metabolism, stress prevention and cytoskeletal proteins in the liver of growing pigs – a proteomic study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2017, 100, s. e225-e236
129. Lepczyński A., Herosimczyk A., Ożgo M., Skomiał J., Taciak M., Barszcz M., Bereżecka N.: Dietary supplementation with dried chicory root triggers changes in the blood serum proteins engaged in the clotting proces and the innate immune response in growing pigs. *Journal of physiology and pharmacology*, 2015, 66(1), s. 47-55
130. Letexier D., Diraison F., Beylot M.: Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations in humans. *The American Journal of clinical nutrition*, 2003, 77(3), s. 559-564
131. Li J., Cechova S., Wang L., Isakson B.E., Le T.H., Shi W.: Loss of reticulocalbin 2 lowers blood pressure and restrains ANG II-induced hypertension in vivo. *American Journal of physiology. Renal physiology*, 2019, 316(6), s. F1141-F1150
132. Li W., Rong R., Zhao S., Zhu X., Zhang K., Xiong X., Yu X., Cui Q., Li S., Chen L., Cai J., Du J.: Proteomic analysis of metabolic, cytoskeletal and stress response proteins in human heart failure. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2012, 16(1), s. 59-71
133. Li X.P., Pleissner K.P., Scheler C., Regitz-Zagrosek V., Salnikow J., Jungblut P.R.: A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis*, 1999, 20(4-5), s. 891-897
134. Lin Y-P., Hsu M-E., Chiou Y-Y., Hsu H-Y., Tsai H-C., Peng Y-J., Lu C-Y., Pan C-Y., Yu W-C., Chen C-H., Chi C-W.: Comparative proteomic analysis of aorta in a subtotal nephrectomy model. *Proteomics*, 2010, 10(13), s. 2429-2443

135. Ling Q., Jacovina A.T., Deora A., Febbraio M., Simantov R., Silverstein R.L., Hempstead B., Mark W.H., Hajjar K.A.: Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(1), s. 38-48
136. Liu H.Y., Ivarsson E., Jonsson L., Holm L., Lundh T., Lindberg J.E.: Growth performance, digestability, and gut development of broiler chickens on diets with inclusion of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Poultry Science*, 2011, 90(4), s. 815-823
137. Loh G., Eberhard M., Brunner R.M., Hennig U., Kuhla S., Kleessen B., Metages C.C.: Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *The Journal of nutrition*, 2006, 136(5), 1198-1202
138. Loufrani L., Henrion D.: Role of the cytoskeleton in flow (shear stress) – induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Medical & Biological engineering & computing*, 2008, 46(5), s. 451-460
139. López J.L.: Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2007, 849(1-2), s. 190-202
140. Lu J., Zou X., Wang Y.: Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17(4), s. 568-578
141. Maddugoda M.P., Crampton M.S., Shewan A.M., Yap A.S.: Myosin Vi and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell-cell contacts in mammalian epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 2007, 178(3), s. 529-540
142. Malkawi A., Pirianov G., Torsney E., Chetter I., Sakalihasan N., Loftus I.M., Nordon I., Huggins C., Charolidi N., Thompson M., Xu X.Y., Cockerill G.W.: Increased expression of lamin A/C correlate with regions of high wall stress in abdominal aortic aneurysms. *Aorta Stamford*, 2015, 3(5), 152-166
143. Mardi J.A.: Extracellular matrix modulation of vascular cel behavior. *Transplant immunology*, 1997, 5(3), s. 179-183
144. Marianowski P., Szymusik I., Hibner M., Barcz E., Wielgoś M.: Zastosowanie proteomiki do badań nad endometriozą. *Ginekologia Polska*, 2013, 84(10), s. 877-881

145. Marieb E.N., Hoehn K.N.: Cardiovascular system: Blood Vessels [W]: Human Anatomy and Physiology, Pearson, 2015
146. Marszał M.P.: Białka opiekuńcze – pomagają czy szkodzą? *Rozmaitości*, 2010, 66(7), s. 484-487
147. Martin-Rojas T., Gil-Dones F., Lopez-Almodovar L.F., Padial L.R., Vivanco F., Barderas M.G.: Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative proces. *Journal of proteome research*, 2012, 11(3), s. 1537-1550
148. Marynowska M., Ożgo M., Robak P., Herosimczyk A., Lepczyński A.: Proteomic strategies in research on the cardiovascular system. *Journal of Elementology*, 2017, 22(3), s. 921-935
149. Maślanka K.: Udział płytek krwi w procesach zapalnych. *Journal of Transfusion Medicine*, 2014, 7(3), s. 102-109
150. Matsumoto K-I., Maniwa T., Tanaka T., Satoh K., Okunishi H., Oda T.: Proteomic analysis of calcified abdominal and thoracic aortic aneurysms. *International journal of molecular medicine*, 2012, 30(2), s. 417-429
151. Mayr U., Mayr M., Yin X., Begum S., Tarelli E., Wait R., Xu Q.: Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics*, 2005, 5(17), s. 4546-45
152. Mayr U., Mayr M., Yin X., Begum S., Tarelli E., Wait R., Xu Q.: Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics*, 2005, 5(17), s. 4546-4557
153. McCurdy T.R., Bhakta V., Eltringham-Smith L.J., Gataiance S., Fox-Robichaud A.E., Sheffield W.P.: In vivo clearance of alpha-1 acid glycoprotein is influenced by the extent of its N-linked glycosylation and by its interaction with the vessel wall. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, doi: [10.1155/2012/292730](https://doi.org/10.1155/2012/292730)
154. Miller I., Wait R., Sipos W., Gemeiner M.: A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Research in Veterinary Science*, 2009, 86(2), s. 362-367
155. Mojka K.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki – charakterystyka i funkcje. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2014, 95(3), s. 541-549
156. Molacek J., Mares J., Treska V., Houdlek K., Baxa J.: Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surgery Today*, 2014, 44(1), s. 142-151

157. Mortensen A., Poulsen M., Frandsen H.: Effect of long chain fructan Raftline HP on blood lipid and spontaneous atherosclerosis in low density receptor knockout mice. *Nutrition Research*, 2002, 22(4), s. 473-480
158. Mostowy S., Cossart P.: Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature review. Molecular Cell Biology*, 2012, 13(3), s. 183-194
159. Nakamura T., Fox-Robichaud A., Kikkawa R., Kashiwagi A., Kojima H., Fujimiya M., Wong N.C.: Transcription factors and age-related decline in apolipoprotein A-I expression. *Journal of lipid research*, 1999, 40(9), s. 1709-1718
160. Nemcova R., Bomba A., Gancarcikova S., Herich R., Guba P.: Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosaccharides on the faecal microflora in weanling piglets. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 1999, 112(6-7), s. 225-228
161. Nieminen M., Henttinen T., Merinen M., Marttila-Ichihara F., Eriksson J.E.: Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(2), s. 156-162
162. Nowak A., Klimowicz A., Bielecka-Grzela S., Piechota M.: Inulina – cenny składnik żywieniowy. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*, 2012, 58(1), s. 62-65
163. O'Brien T., Nguyen T.T., Hallaway B.J., Hodge D., Bailey K., Holmes D., Kottke B.A.: The role of lipoprotein A-I and lipoprotein A-I/A-II in predicting coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1995, 15(2), s. 228-231
164. Olumee-Shabon Z., Chattopadhaya C., Myers M.J.: Proteomics profiling of swine serum following lipopolysaccharide stimulation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2020, 34, s. e8639
165. Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R.: Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological reviews*, 2004, 84(3), s. 767-801
166. Ożgo M., Robak P., Dratwa-Chałupnik A., Lepczyński A.: Proteomika w badaniach na zwierzętach – osiągnięcia i oczekiwania. *Przegląd hodowlany*, 2014, 6, s. 24-26

167. Ożgo M., Skrzypczak W.F., Herosimczyk A., Mazur A.: Proteomika a fizjologia i patofizjologia nerek. *Medycyna weterynaryjna*, 2007, 63(10), s. 1146-1150
168. Paßlack N., Vahjen W., Zentek J.: Dietary inulin affects the intestinal microbiota in sows and their suckling piglets. *BMC Veterinary Research*, 2015, 11(51), s. 1-8
169. Patterson J.K., Yasuda K., Welch R.M, Miller D.D, Lei X.G.: Supplemental Dietary Inulin of Variable Chain Lengths Alters Intestinal Bacterial Populations in Young Pigs. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140(12), s. 2158-2161
170. Paul R.J., Bowman P.S., Kolodney M.S.: Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and $[Ca^{2+}]_i$ in porcine coronary arteries. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 2000, 279(5), s. H2493-2501
171. Pejsak Z., Truszczyński M.: Przyczyny i konsekwencje wprowadzania zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u świń oraz możliwości przeciwdziałania skutkom ich wycofania. *Życie Weterynaryjne*, 2006, 81(6), s. 380-382
172. Perlenberg C., Kind A., Schnieke A.: Genetically engineered pigs as models for human disease. *Disease Models & Mechanisms*, 2018, 11(1), dmm030783
173. Pierce K.M., Sweeney T., Brophy P.O., Callan J.J., Fitzpatrick E., McCarthy P., O'Doherty J.V.: The effect of lactose and inulin on intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentration in the gastrointestinal tract of the weanling pig. *Animal Science*, 2006, 82(3), s. 1-8
174. Pineiro M., Asp N-G., Reid G., Macfarlane S., Morelli L., Brunser O., Tuohy K.: FAO Technical meeting on prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 2008, 42(3), s. 156-159
175. Pleissener K.P., Regitz-Zagrosek V., Weise C., Neuss M., Krudewagen B., Soding P., Buchner K., Hucho F., Hildebrandt A., Fleck E.: Chamber-specific expression of human myocardial proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, 16(5), s. 841-850
176. Pomastowski P., Buszewski B.: Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 53, s. 167-177

177. Powell M.D., Manandhar G., Spate L., Sutovsky M., Zimmerman S., Sachdev S.C., Hannink M., Prather R.S., Sutovsky P.: Discovery of putative oocyte quality markers by comparative ExacTag proteomics. *Proteomics – Clinical Applications*, 4(3), s. 337-351
178. Prather R.S., Lorson M., Ross J.W., Whyte J.J., Walters E.: Genetically Engineered Pig Models for Human Diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1, s. 203-219
179. Prather R.S., Shen M., Dai Y.: Genetically modified pigs for medicine and agriculture. *Biotechnology & Genetic engineering reviews*, 2008, 25, s. 245-265
180. Qin H., Ishiwata T., Wang R., Kudo M., Yokoyama M., Naito Z., Asano G.: Effects of Extracellular Matrix on Phenotype Modulation and MAPK Transduction of Rat Aortic Smooth Muscle Cells *in Vitro*. *Experimental and Molecular Pathology*, 2000, 69(2), s. 79-90
181. Radosz A., Obuchowicz A.: Potencjalne znaczenie diagnostyczne lipokaliny neutrofilowej związanej z żelatynazą. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 2013, 67(1), s. 61-66
182. Ragnauth C.D., Warren D.T., Liu Y., McNair R., Tajsic T., Figg N., Shroff R., Skepper J., Shanahan C.M.: Prelamin A, acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*, 2010, 121(20), s. 2200-2210
183. Rault-Nania M-H., Gueux E., Demougeot C., Demigne C., Rock E., Mazur A.: Inulin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The British Journal of Nutrition*, 2006, 96(5), 840-844
184. Regent A., Ly K.H., Lofek S., Clary G., Tamby M., Tamas N., Federici C., Broussard C., Chafey P., Liaudet-Coopman E., Humbert M., Perros F., Mounthon L.: Proteomic analysis of vascular smooth muscle cells in physiological condition and in pulmonary arterial hypertension: Toward contractile versus synthetic phenotypes. *Proteomics*, 2016, 16(20), s. 2637-2649
185. Rescher U., Gerke V.: Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(Pt 13), s. 2631-2639

186. Rideout T.C., Fan M.Z.: Nutrient utilisation in response to dietary supplementation of chicory inulin in growing pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84, s. 1005-1012
187. Ritsema T., Smeekens S.: Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 2003, 6(3), s. 223-230
188. Robak P., Ożgo M., Lepczyński A., Herosimczyk A., Barszcz M., Taciak M., Skomiał J.: Proteome changes in renal cortex and medulla induced by dietary supplementation with inulin-type fructans in growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2019, 103(6), s. 1837-1847
189. Roberfroid M.B.: Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition*, 2007, 137(11), s. 2493S-2502S
190. Rogowska-Wrzesińska A., Le Bihan M-C., Thaysen-Andersen M., Roepstorff P.: 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of proteomics*, 2013, 88, s. 4-13
191. Sabater-Molina M., Larque E., Torrella F., Plaza J., Ramis G., Zamora S.: Effects of fructooligosaccharides on cecum polyamine concentration and gut maturation in early-weaned piglets. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2011, 48(3), 230-236
192. Samolińska W., Grela E.R.: Comparative Effects of Inulin with Different Polymerization Degrees on Growth Performance, Blood Trace Minerals, and Erythrocyte Indices in Growing-Finishing Pigs. *Biological trace element research*, 2017, 176(1), s. 130-142
193. Sartore S., Chiavegato A., Faggini E., Franch R., Puato M., Ausoni S., Pauletto P.: Contribution of adventitial fibroblasts to neointima and vascular remodeling: from Innocent bystander to active participant. *Circulation Research*, 2001, 89, s. 1111-1121
194. Schiffers P.M., Henrion D., Boulanger C.M., Colucci-Guyon E., Langa-Vuves F., van Essen H., Fazzi G.E., Levy B.I., De Mey J.G.: Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin – deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 2000, 20(3), s. 611-616
195. Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J.: Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism. *The British Journal of Nutrition*, 2002, 87(Suppl 2), s. S179-S186

196. Shamaei-Tousi A., Halcox J.P., Henderson B.: Stressing the obvious? Cell stress and cell stress proteins in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 2007, 74(1), s. 19-28
197. Shekhonin B.V., Domogatsky S.P., Muzykantov V.R., Idelson G.L., Rukosuev V.S.: Distribution of type I, II, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Collagen and Related Research*, 1982, 2(2), s. 151-175
198. Sheng Y., Zhu L.: The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 2018, 10(1), s. 17-28
199. Skowronek M., Fiedurek J.: Inulina i inulinazy: właściwości, zastosowania, perspektywy. *Przemysł spożywczy*, 2003, 57(3), s. 18-20
200. Smolarczyk K., Gils A., Boncela J., Declerck P.J., Cierniewski C.S.: Function – stabilizing mechanism of plasminogen activator inhibitor type 1 induced upon binding to alpha1 – acid glycoprotein. *Biochemistry*, 2005, 44(37), s. 12384-12390
201. Sobolewska S., Grela E.R., Skomiał J.: Inulina i jej oddziaływanie u ludzi i zwierząt [w:] *The use of flax and inulin in nutrition and food production*. Ed. By A. Czech, R. Klebniuk. Wyd. Stowarzyszenie Rozwoju Regionalnego i Lokalnego „PROGRESS”, Lublin, 2012, s. 65-88
202. Song J., Stastny J., Fosslie E., Robertson Jr A.L.: Effect of aging on human aortic protein composition. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic analysis. *Experimental and molecular pathology*, 1985, 43(3), 297-304
203. Sopolńska E., Krzesiński P., Piotrowicz K., Gielerak G.: Współczesne metody oceny czułości baroreceptorów tętniczych w praktyce klinicznej. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2012, 6(2), s. 55-67
204. Sowa G.: Caveolae, caveolins, cavins and endothelial cell function: new insights. *Frontiers in physiology*, 2012, 2, doi: [10.3389/fphys.2011.00120](https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00120)
205. Spofford C.M., Chilian W.M.: The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle. *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 2001, 280, s. H1354-H1360

206. Stastny J., Fosslien E., Robertson Jr A.L.: Human aortic intima protein composition during initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis*, 1986, 60(2), s. 131-139
207. Stender S., Hjelm E.: In vivo influx of free and esterified plasma cholesterol into human aortic tissue without atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 1984, 74(5), s. 1871-1881
208. Su S-C., Maxwell S.A., Bayless K.J.: Annexin 2 regulates endothelial morphogenesis by controlling AKT activation and junctional integrity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(52), s. 40624-40634
209. Swindle M.M., Makin A., Herron A.J., Clubb Jr F.J., Frazier K.S.: Swine as model in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary Pathology*, 2012, 49(2), s. 344-356
210. Śliżewska K., Nowak A., Barczyńska R., Libudzisz Z.: Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2013, 1(86), s. 5-20
211. Świątkiewicz S., Świątkiewicz M.: Zastosowanie fruktanów o właściwościach prebiotycznych w żywieniu zwierząt gospodarskich. *Medycyna Weterynaryjna*, 2008, 64(8), s. 987-990
212. Tabung F.K., Birmann B.M., Epstein M.M., Martinez-Maza O., Breen E.C., Wu K., Giovannucci E.L.: Influence of Dietary Patterns on Plasma Soluble CD14, a Surrogate Marker of Gut Barrier Dysfunction. *Current Developments in Nutrition*, 2017, 1(11), 1-11
213. Tarkowski B., Girstun A.: Zastosowanie spektrometrii mas w poszukiwaniach biomarkerów chorób nowotworowych. *Kosmos problemy nauk biologicznych*, 2005, 54(4), s. 331-343
214. Timpl R.: Macromolecular organization of basement membranę. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, 8, 618-624
215. Tokutami Y., Okamoto S., Matsumoto K., Otagiri M., Nishi K., Tokutami N.: Effects of alpha(1)-acid glycoprotein on isomeric tension of mouse aorta. *European journal of pharmacology*, 2003, 477(2), s. 137-141
216. Tothova C., Nagy O., Kovac G.: The use use of acute phase proteins as biomarkers of diseases in cattle and swine [W]: *Acute Phase Protein*. IntechOpen, DOI: 10.5772/55857

217. Trafalska E., Grzybowska K.: Probiotyki – alternatywa dla antybiotyków? *Wiadomości lekarskie*, 2004, 57(9-10), s. 491-498
218. Trevisi P., Botti S., Lauridsen C., Pérez J., Papadopoulos D., Roselli M., Levic J., Zentek J.: COST Action FA1401 “European network on the factors affecting the gastro-intestinal microbial balance and the impact on the health status of pigs (PiGutNet)”. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2015, 11, s. 86-88
219. Trojan P., Janik M., Przybyło M.: Śródbłonek – niedoceniony organ. 1. Budowa i rola w procesach fizjologicznych. *Kosmos, Problemy nauk biologicznych*, 2014, 63(4), s. 555-568
220. Trucker W.D., Arora Y., Mahajan K.: *Anatomy, Blood Vessels [W]: StatPearls (Internet)*. Treasure Island(FL):StatPearls Publishing, 2020
221. Tsamis A., Krawiec J.T., Vorp D.A.: Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2013, 10(83), 20121004, doi:10.1098/rsif.2012.1004
222. Tsang H.G., Rashdan N.A., Whitelaw C.B.A., Corcoran B.M., Summers K.M., MacRae V.E.: Large animal models of cardiovascular disease. *Cell biochemistry and function*, 2016, 34(3), s. 113-132
223. Turano C., Gaucci E., Grillo C., Chichiarelli S.: Erp57/GRP58: A protein with multiple functions. *Cellular&molecular biology letters*, 2011, 16(2011), s. 539-563
224. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigyarto C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P-H., Berling H., Tegel H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F.: Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015, 347(6220), s. 1260419
225. Untea A.E., Criste R.D., Souffrant W.B., Janczyk P., Vladescu L., Dragomir C.: Availability of microelements in recently weaned piglets fed diet supplemented with inulin. *Czech Journal of Animal Science*, 2018, 58(8), s. 369-374

226. Urbański K., Nowak M., Guzik T.I., Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. *Postępy Biochemii*, 2013, 59(4), s. 424-431
227. Van Loo J.: How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion animals. *The Journal of nutrition*, 2007, 137(11), s. 2594S-2597S
228. Vanhoof K., De Schrijver R.: Availability of minerals in rats and pigs fed non-purified diets containing inulin. *Nutrition Research*, 1996, 16(6), 1017-1022
229. Verma N., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S.: Recent advantages in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics*, 2011, 11(4), s. 776-793
230. Virtakoivu R., Mai A., Mattila E., De Franceschi N., Imanishi S.Y., Corthals G., Kaukonen R., Saari M., Cheng F., Torvaldson E., Kosma V-M., Mannermaa A., Muharram G., Gilles C., Eriksson J., Soini Y., Lorens J.B., Ivaska J.: Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Research*, 2015, 75(11), s. 2349-2362
231. Vivanco F., Lopez-Bescos L., Tunon J., Egido J.: Proteomics and cardiovascular disease. *Revista espanola de cardiologia*, 2003, 56(3), s. 289-302
232. Vodicka P., Smetana Jr K., Dvorankova B., Emerick T., Xu Y.Z., Ourednik J., Ourednik V., Motlik J.: The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1049, s. 161-171
233. Vuoriluoto K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi J-P., Gjerdrum C., Tiron C., Lorens J.B., Ivaska J.: Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 2011, 30(12), s. 1436-1448
234. Walters E.M., Prather R.S.: Advancing swine models for human health and diseases. *Missouri Medicine*, 2013, 110(3), s. 212-215
235. Wang B., Wu G., Zhou Z., Dai Z., Sun Y., Ji Y., Li W., Wang W., Liu C., Han F., Wu Z.: Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids*, 2015, 47(10), s. 2143-2154
236. Wang H-Q., Yang H., Tang Q., Gong Y-C., Fu Y-H., Wan F., Yang B., Guo R., Zhong Y-L., Zhu J-M., Zhang Z.: Identification of vinculin as a potential

- diagnostic biomarker for acute aortic dissection using label-free proteomics. *BioMed Research International*, 2020, 7806409, doi: 10.1155/2020/7806409
237. Wasilewski J., Kiljański T., Mirola K., Głowacki J.: Znaczenie naprężeń ścinających i rola numerycznej mechaniki płynów w badaniach nad patomechanizmem miażdżycy. *Folia Cardiologica Excerpta*, 2012, 7(2), s. 95-100
238. Weekes J., Wheeler C.H., Yan J.X., Weil J., Eschenhagen T., Schltysik G., Dunn M.J. Bovine dilated cardiomyopathy proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*, 1999, 20(4-5), s. 898-793
239. Wen Z.S., Lu J.J., Zou X.T.: Effects of sodium butyrate on the intestinal morphology and dna-binding activity of intestinal nuclear factor- κ B in weanling pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(6), 814-821
240. Whitesell T.R., Kennedy R.M., Carter A.D., Rollins E-L., Georgijevic S., Santoro M.M., Childs S.J.: An α -smooth muscle actin (*acta2/asma*) zebra fish transgenic line marking vascular mural cells and visceral smooth muscle cells. *PLoS One*, 2014, 9(3), s. e90590
241. Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F., Williams K.L.: Progress with proteome projects: why all preteins expressed by genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 1996, 13, s. 19-50
242. Wu R.Y., Abdullah M., Määttänen P., Pilar A.V.C., Scruten E., Johnson-Henry K.C., Napper S., O'Brien C., Jones N.L., Sherman P.M.: Protein kinase C σ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Scientific Reports*, 2017, 18(7), s. 1-10
243. Yao W., Fan W., Huang C., Zhong H., Chen X., Zhang W.: Proteomic analysis for anti-atherosclerotic effect of tetrahydroxystilbene glucoside in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2013, 67(2), s. 140-145
244. Yasuda K., Dawson H.D., Wasmuth E.V., Roneker C.A., Chen C., Urban J.F., Welch R.M., Miller D.D., Lei X.G.: Supplemental Dietary Inulin Influences Expression of Iron and Inflammation Related Genes in Young Pigs. *The Journal of Nutrition*, 2009, 139(11), s.2018-2023

245. Yasuda K., Roneker K.R., Miller D.D., Welch R.M., Lei X.G.: Supplemental dietary inulin affects the bioavailability of iron in corn and soybean meal to young pigs. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136(12), 3033-3038
246. Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A.: Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual review of biomedical engineering*, 2009, 11, s. 49-79
247. Yi M., Schnitzer J.E.: Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1 – null mice. *PNAS*, 2009, 106(42), s. 17886-17891
248. Yu F., Li B-Y., Li X-L., Cai Q., Zhang Z., Cheng M., Yin M., Wang J-F., Zhang J-H., Lu W-D., Zhou R-H., Gao H-Q.: Proteomic analysis of aorta and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice reveal a critical role of milk fat globule epidermal growth factor-8 in diabetic arterial damage. *PloS One*, 2012, 7(12), s. 1-12
249. Zhang Y., Chen H., Zhu W., Yu K.: Cecal Infusion of Sodium Propionate Promotes Intestinal Development and Jejunal Barrier Function in Growing Pigs. *Animals*, 2019, 9(6), s. 1-10
250. Zhao Y., Xiao H., Long W., Pearce W.J., Longo L.D.: Expression of several cytoskeletal proteins in ovine cerebral arteries: developmental and functional considerations. *The Journal of Physiology*, 2004, 558(Pt 2), s. 623-632
251. URL 1: https://www.alibaba.com/product-detail/Chicory-Inulin-90-Powder_60513130065.html

ANEKS

Tabela A. Charakterystyka zidentyfikowanych białek aorty rosnących prosiąt. Numery spotów odpowiadają numerom na mapie z rys 3-6. Dla każdego białka, na podstawie bazy danych (UniProt/NCBI), podano jego nazwę genu, numer akcesyjny, ilość dopasowanych peptydów, stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej, teoretyczną masę (MW) i punkt izoelektryczny, lokalizację komórkową oraz organizm, któremu zostało przypisane zidentyfikowane białko. W tabeli zamieszczono również wartości eksperymentalne MW i pI. Białka opisane nazwą w języku angielskim nie posiadają odpowiednika polskiej nazwy. Skróty: LK – lokalizacja komórkowa; CP – cytoplazma, ER – retikulum endoplazmatyczne; L – lizosomy; EX – macierz zewnątrzkomórkowa; MT – mitochondrium; N – jądro komórkowe; CS – cytoszkielet; AG – aparat Golgiego; S – synapsy; CM - błona komórkowa.

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa genu	Nr akcesyjny	Ilość dopasowanych peptydów	Stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej (%) / MASCOT	Teoretyczne pI/MW (pH/kDa)	Eksperymentalne pI/MW (pH/kDa)	LK	Organizm
1	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	9	12/79	5.23/109.69	5.4/122.2	CP	<i>Sus scrofa</i>
2	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	20	25/178	5.23/109.69	5.4/121.8	CP	<i>Sus scrofa</i>
3	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	18	24/144	5.23/109.69	5.4/121.9	CP	<i>Sus scrofa</i>
4	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	18	25/166	5.23/109.69	5.5/121.9	CP	<i>Sus scrofa</i>
5	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	18	21/145	5.23/109.69	5.5/122.6	CP	<i>Sus scrofa</i>
6	Łańcuch alfa kolagenu – 1 (VI)	COL6A1	XP_020926753	19	25/187	5.23/109.69	5.5/122.2	CP	<i>Sus scrofa</i>
7	Endoplazmina	HSP90B1	Q29092	23	29/142	4.75/92.69	5.2/97.0	ER	<i>Sus scrofa</i>
8	Kompleks białek GATOR MIOS	MIOS	Q8VE19	12	19/62	6.27/99.93	5.0/80.2	L	<i>Mus musculus</i>
9	Kalretikulina	CALR	P28491	21	54/251	4.32/48.43	4.5/73.5	ER	<i>Sus scrofa</i>
10	Kalretikulina	CALR	P28491	18	47/201	4.32/48.43	4.5/71.1	ER	<i>Sus scrofa</i>

11	Izoforma 1 fibuliny 5	FBLN5	XP_020955282	16	30/132	4.49/54.24	4.8/71.7	EX	<i>Sus scrofa</i>
12	Izoforma 1 fibuliny 5	FBLN5	XP_001929062	14	29/137	4.53/52.45	4.8/72.3	EX	<i>Sus scrofa</i>
13	Alfa-2-HS-glikoproteina (Fragment)	AHSG FETUA	P29700	6	29/64	5.50/39.20	4.9/66.5	EX	<i>Sus scrofa</i>
14	Keratyna 10 cytoszkieletu typu I	KRT10	P13645	11	20/84	5.13/59.02	4.9/66.6	EX	<i>Homo sapiens</i>
15	Alfa-2-HS-glikoproteina	AHSG	XP_005652426	8	36/109	5.50/39.56	5.0/66.1	EX	<i>Sus scrofa</i>
16	Alfa-2-HS-glikoproteina	AHSG	XP_005652426	8	36/90	5.50/39.56	5.1/66.2	EX	<i>Sus scrofa</i>
17	Białkowa izomeraza dwusiarczkowa	P4HB	XP_020922086	24	57/253	4.78/56.73	5.1/60.7	ER EX	<i>Sus scrofa</i>
18	Białko wiążące histony RBBP4	RBBP4	Q3MHL3	8	20/78	4.74/47.91	5.1/58.1	N	<i>Bos taurus</i>
19	Inhibitor rybonukleazy	RNH1	P10775	19	65/223	4.76/50.70	5.0/52.7	CPN	<i>Sus scrofa</i>
20	Izoforma 3 retikulokalbin 2	RCN2	XP_020953684	8	35/87	4.18/36.21	4.2/52.7	ER	<i>Sus scrofa</i>
21	Kwaśna alfa-1 glikoproteina (częściowa)	ORM1	AAA30983	6	36/83	5.83/21.11	4.2/50.6	CP EX	<i>Sus scrofa</i>
22	Kwaśna alfa-1 glikoproteina (częściowa)	ORM1	AAA30983	6	36/81	5.83/21.11	4.3/48.5	CP EX	<i>Sus scrofa</i>
23	Kwaśna alfa-1 glikoproteina (częściowa)	ORM1	AAA30983	6	36/94	5.83/21.11	4.4/47.7	CP EX	<i>Sus scrofa</i>
24	Izoforma 1 kalumeniny	CALU	XP_003484071	10	48/86	4.49/37.17	4.6/49.0	ER AP	<i>Sus scrofa</i>
25	Retikulokalbina 1	RCN1	XP_003353965	14	34/135	5.08/46.74	4.9/49.5	ER AG	<i>Sus scrofa</i>
26	Izoforma 2 wimentyny	VIM	XP_005668164	15	34/85	5.09/49.25	4.9/48.3	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
27	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	35	61/315	5.06/53.69	5.1/48.4	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>

28	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	34	59/335	5.06/53.69	5.2/50.4	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
29	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	31	58/306	5.06/53.69	5.3/52.8	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
30	Mitochondrialna podjednostka beta syntazy ATP	ATP5B	XP_001929445	21	51/173	5.40/59.94	5.3/54.4	MT	<i>Sus scrofa</i>
31	Łańcuch beta tubuliny	TUBB	Q767L7	28	70/291	4.78/50.06	5.3/57.3	CPCS MT	<i>Sus scrofa</i>
32	Łańcuch beta tubuliny	TUBB	Q767L7	26	59/250	4.78/50.06	5.2/58.4	CP CSM T	<i>Sus scrofa</i>
33	Mitochondrialna syntaza ATP kompleksowej podjednostki beta F1 transportującej H ⁺	ATP5B	ABD77251	31	72/260	4.99/47.06	5.4/54.8	MT	<i>Sus scrofa</i>
34	Wimentyna	VIM	P02543	20	42/138	5.06/53.69	5.5/54.8	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
35	Izoforma 2 wimentyny	VIM	XP_005668164	34	66/313	5.09/49.25	5.5/57.4	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
36	Łańcuch alfa 1B tubuliny	TUBA1B	Q2XVP4	11	42/97	4.94/50.80	5.5/58.5	MT N	<i>Sus scrofa</i>
37	Serpina A3-8	LOC10015389 9	XP_020955331	8	27/84	5.96/46.47	5.3/67.2	CP	<i>Sus scrofa</i>
38	Podjednostka PR65 fosfatazy białkowej 2A	PPP2R1A	P54612	12	20/99	5.00/66.08	5.3/71.2	MT N	<i>Sus scrofa</i>
39	Wimentyna	VIM	P02543	13	28/89	5.06/53.69	5.4/70.6	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
40	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	34	65/262	5.06/53.69	5.4/71.6	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
41	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	37	69/317	5.06/53.69	5.4/62.4	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>

42	Wimentyna	VIM	XP_005668163	42	74/348	5.06/53.69	5.4/62.6	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
43	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	37	68/176	5.06/53.69	5.5/62.9	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
44	Wimentyna	VIM	P02543	27	53/214	5.06/53.69	5.6/63.5	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
45	Wimentyna	VIM	P02543	31	51/269	5.06/53.69	5.2/50.4	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
46	Wimentyna	VIM	P02543	14	34/100	5.06/53.69	5.1/49.3	CPCS N, S	<i>Sus scrofa</i>
47	Izoforma 2 wimentyny	VIM	XP_005668164	19	41/96	5.09/49.25	5.1/48.4	CPCS N, S	<i>Sus scrofa</i>
48	Wimentyna	VIM	P02543	10	22/71	5.06/53.69	5.0/45.8	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
49	Wimentyna	VIM	P02543	13	28/86	5.06/53.69	5.1/45.3	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
50	Izoforma 2 wimentyny	VIM	XP_005668164	22	42/183	5.09/49.25	5.0/44.6	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
51	Łańcuch beta tropomiozyny	TPM2	NP_001123419	21	51/184	4.62/33.38	4.9/40.1	CS	<i>Sus scrofa</i>
52	Izoforma 1 łańcucha alfa-4 tropomiozyny	TPM4	XP_005661255	18	48/179	4.71/32.89	5.0/38.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
53	Izoforma 14 łańcucha alfa-1 tropomiozyny	TPM1	XP_005659583	21	44/162	4.71/32.53	5.0/37.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
54	Izoforma 8 łańcucha alfa-1 tropomiozyny	TPM1	XP_005659578	12	35/108	4.69/32.81	5.0/36.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
55	Białko 1 związane z kaweolami	CAVIN1	Q6NZI2	8	17/62	5.51/43.45	4.8/34.8	N	<i>Homo sapiens</i>
56	Czynnik elongacyjny 1-beta	EEF1B2	NP_001230453	9	42/105	4.51/24.96	4.8/32.9	CP	<i>Sus scrofa</i>

57	Białko 14-3-3 epsilon	YWHAE	P62261	22	68/201	4.63/29.33	4.9/32.5	N	<i>Sus scrofa</i>
58	Białko 14-3-3 theta	YWHAQ	XP_010336279	7	47/82	4.79/17.93	5.0/31.1	CPN	<i>S. boliviensis</i>
59	Białko aktywujące zeta 3-monooksygenazę tyrozynową/5-monooksygenazę tryptofanową	YWHAZ	ABI29193	10	48/112	4.53/20.07	5.0/30.6	MTN	<i>Sus scrofa</i>
60	Białko 14-3-3 gamma	YWHAG	P68252	6	39/66	4.80/28.41	5.1/31.2	N	<i>Sus scrofa</i>
61	Białko 14-3-3 beta/alfa	YWHAB	P31946	7	33/74	4.76/28.18	5.1/30.4	N	<i>Homo sapiens</i>
62	Białko 14-3-3 zeta/delta	YWHAZ	P63103	6	32/66	4.73/27.90	5.0/31.6	N	<i>Bos taurus</i>
63	Inhibitor 1 dysocjacji GDP specyficzny dla białek Rho	ARHGDIA	NP_001188313	11	54/132	5.12/23.44	5.5/29.0	CPCS	<i>Sus scrofa</i>
64	Apolipoproteina A-I	APOA1	AAA30992	11	37/94	5.38/30.31	5.4/27.5	EX	<i>Sus scrofa</i>
65	Dermatopontyna	DPT	P45846	6	43/62	4.86/22.55	4.8/23.7	EX	<i>Sus scrofa</i>
66	Antygen B4 związany z czerniakiem	MAGEB4	O15481	6	27/62	9.28/39.01	4.6/23.6	CP	<i>Homo sapiens</i>
67	Polipeptyd 6 miozyny lekkiej	MYL6	P60662	7	33/62	4.56/17.09	4.5/15.9	CMN	<i>Sus scrofa</i>
68	Regulatorowy polipeptyd 9 miozyny lekkiej	MYL9	P29269	7	49/74	4.80/19.87	5.1/19.7	CMCP	<i>Sus scrofa</i>
69	Keratyna 10 cytoszkieletu typu I	KRT10	P13645	8	20/72	5.13/59.02	6.4/26.9	EX	<i>Homo sapiens</i>
70	Peroksyredoksyna 6	PRDX6	Q9TSX9	10	62/90	5.73/25.08	6.2/30.0	CPL	<i>Sus scrofa</i>
71	Podjednostka alfa-1 białka wiążącego F-aktynę	CAPZA1	A4FUA8	7	34/61	5.53/33.08	5.9/38.5	CS	<i>Bos taurus</i>
72	Aneksyna A1	ANXA1	P19619	9	28/68	6.43/39.02	6.6/40.4	CMCP	<i>Sus scrofa</i>
73	Czynnik elongacyjny 1-gamma	EEF1G	Q29387	9	38/94	6.16/49.94	6.5/52.2	CP	<i>Sus scrofa</i>
74	Izoforma 1 alfa enolazy	ENO1	XP_020950937	13	36/87	6.44/47.60	6.6/55.8	CPN	<i>Sus scrofa</i>

75	Izoforma 1 alfa enolazy	ENO1	XP_020950937	11	35/86	6.44/47.60	6.8/55.4	CP N	<i>Sus scrofa</i>
76	Prekursor białkowej izomerazy dwusiarczkowej A3	PDIA3	NP_001182041	16	34/108	5.93/57.28	6.4/61.6	CS	<i>Sus scrofa</i>
77	Aneksyna A4	ANXA4	NP_001161111	10	37/106	5.71/36.03	6.4/49.4	CP	<i>Sus scrofa</i>
78	Czynnik 1-gamma elongacyjny (fragment)	EEF1G	Q29387	9	36/67	6.16/49.94	6.4/52.6	CP	<i>Sus scrofa</i>
79	Mitochondrialna izoforma 2 aminotransferazy ornityny	OAT	XP_005671603	8	32/81	6.44/48.85	6.4/51.4	CP MT	<i>Sus scrofa</i>
80	Inhibitor beta dysocjacji GDP specyficzny dla białek Rho	GDI2	Q6Q7J2	11	26/74	6.31/50.75	6.2/52.6	CPA G	<i>Sus scrofa</i>
81	Białko związane z aktyną 3	ACTR3	NP_001127815	11	35/85	5.61/47.85	6.1/54.1	CS	<i>Sus scrofa</i>
82	Mitochondrialna izoforma 4, podjednostki kompleksu cytochromu b-c1	UQCRC1	XP_001926664	11	38/89	5.76/53.35	5.9/52.2	MT	<i>Sus scrofa</i>
83	Białko zawierające domenę tioredoksyny 5	TXNDC5	XP_020955819	13	33/135	5.94/48.70	5.9/54.4	ER	<i>Sus scrofa</i>
84	Heterogenna jądrowa rybonukleoproteina H	HNRNPH1	P31943	15	40/138	5.89/49.48	6.3/59.1	N	<i>Sus scrofa</i>
85	Mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa	ALDH2	Q2XQV4	17	43/208	6.43/57.34	6.2/60.7	CP MT	<i>Sus scrofa</i>
86	Septyna 8	SEPT8	ANH21174	11	35/100	5.67/56.22	6.2/59.8	N	<i>Sus scrofa</i>
87	Albumina surowicza	ALB	P08835	9	18/63	6.08/71.64	6.3/63.6	CP EX	<i>Sus scrofa</i>
88	Prekursor białkowej izomerazy dwusiarczkowej A3	PDIA3	NP_001182041	19	37/150	5.93/57.28	6.1/63.5	ER	<i>Sus scrofa</i>
89	Łańcuch alfa 1B tubuliny	TUBA1B	Q2XVP4	10	32/81	4.94/50.80	5.9/55.8	MT N	<i>Sus scrofa</i>
90	Izoforma 2 wimentyny	VIM	XP_005668164	19	49/121	5.09/49.25	5.9/57.2	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
91	Izoforma 1 wimentyny	VIM	XP_005668163	25	55/198	5.06/53.69	6.0/56.8	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>

92	Prekursor 3 związany z białkową izomerazą dwusiarczkową	PDIA3	ACA57910	12	41/88	6.92/34.59	6.1/67.2	ER	<i>Sus scrofa</i>
93	Podjednostka alfa białka 1 kompleksu T	TCP1	NP_001230356	14	28/98	5.71/60.83	6.1/67.4	CP	<i>Sus scrofa</i>
94	Izoforma 2 heterogennej jądrowej rybonukleoproteiny K	Hnrnpk	XP_006981741	12	31/88	5.39/51.13	5.8/73.3	N	<i>Sus scrofa</i>
95	Białko szoku cieplnego A8	HSPA8	NP_001230836	26	50/236	5.37/71.05	5.8/77.1	N	<i>Sus scrofa</i>
96	Białko szoku cieplnego A8	HSPA8	NP_001230836	21	51/191	5.37/71.05	5.8/77.7	N	<i>Sus scrofa</i>
97	Lamina B1	LMNB1	XP_003123930	16	31/99	5.08/66.67	5.7/77.0	N	<i>Sus scrofa</i>
98	Wimentyna	VIM	P02543	11	28/62	5.06/53.69	5.6/74.8	CP CS N, S	<i>Sus scrofa</i>
99	Przejsiowa ATPaza retikulum endoplazmatycznego	VCP	P03974	10	20/64	5.13/89.91	5.6/81.6	CP ER N	<i>Sus scrofa</i>
100	Izoforma 2 białka o masie 78 kDa regulowanego poziomem glukozy	HSPA5	XP_001927830	27	45/176	5.06/72.34	5.5/81.1	ER N	<i>Sus scrofa</i>
101	Izoforma 2 białka o masie 78 kDa regulowanego poziomem glukozy	HSPA5	XP_001927830	36	50/313	5.06/72.34	5.4/81.0	ER N	<i>Sus scrofa</i>
102	Częściowa aktyna	ACTA	ACD13863	11	60/83	4.98/27.59	5.6/86.7	CS	<i>Sus scrofa</i>
103	Białko szoku cieplnego HSP 90 - alfa	HSP90AA1	NP_999138	12	24/87	4.93/85.12	5.4/90.1	CP MT	<i>Sus scrofa</i>
104	Gammaglutamylotransferaza białkowo-glutaminowa 2	TGM2	XP_003360037	15	34/116	5.19/78.19	5.6/89.6	CP	<i>Sus scrofa</i>
105	Aktyna alfa mięśnia szkieletowego	ACTA1	P68137	10	37/74	5.23/42.37	5.6/92.6	CS	<i>Sus scrofa</i>
106	Przejsiowa ATPaza retikulum endoplazmatycznego	VCP	NP_999445	21	36/167	5.13/89.92	5.6/96.0	CP ER MI N	<i>Sus scrofa</i>
107	Alfa aktynina 1	ACTN1	NP_001229990	35	45/245	5.33/103.11	5.4/92.0	CP CS N	<i>Sus scrofa</i>
108	Białko 4 szoku cieplnego 70 kDa	HSPA4	XP_005661711	16	25/124	5.13/95.29	5.6/104.1	CP N	<i>Sus scrofa</i>
109	Alfa aktynina 1	ACTN1	NP_001229990	39	47/260	5.33/103.11	5.7/99.0	CP CS N	<i>Sus scrofa</i>

110	Alfa aktynina 1	ACTN1	NP_001229990	24	31/206	5.33/103.11	5.7/99.7	CPCSN	<i>M. fascicularis</i>
111	Łańcuch alfa kolagenu – 2 (VI)	COL6A2	XP_020938158	13	18/129	6.13/110.44	6.2/120.4	CP	<i>Sus scrofa</i>
112	Łańcuch alfa kolagenu – 2 (VI)	COL6A2	XP_020938158	19	25/131	6.13/110.44	6.1/120.3	CP	<i>Sus scrofa</i>
113	Łańcuch alfa kolagenu – 2 (VI)	COL6A2	XP_020938158	18	24/123	6.13/110.44	6.0/120.6	CP	<i>Sus scrofa</i>
114	Neutralny prekursor alfa – glukozydazy AB	GANAB	NP_999069	24	30/206	5.64/107.11	6.1/103.9	ER	<i>Sus scrofa</i>
115	Izoforma 2 winkuliny	VCL	XP_005671130	38	34/240	5.58/124.31	6.2/108.8	CS	<i>Sus scrofa</i>
116	Winkulina	VCL	P26234	20	22/141	5.62/124.44	6.3/108.3	CS	<i>Sus scrofa</i>
117	Izoforma 3 winkuliny	VCL	XP_005671131	43	43/295	5.83/117.25	6.4/107.7	CS	<i>Sus scrofa</i>
118	Izoforma 3 winkuliny	VCL	XP_005671131	28	33/170	5.83/117.25	6.5/108.7	CS	<i>Sus scrofa</i>
119	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	10	19/83	5.93/85.07	6.0/93.6	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
120	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	18	34/169	5.93/85.07	6.0/93.1	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
121	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	18	36/183	5.93/85.07	6.1/92.7	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
122	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	15	28/132	5.93/85.07	6.2/93.4	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
123	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	10	20/84	5.93/85.07	6.3/94.2	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
124	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	13	25/100	5.93/85.07	6.4/95.0	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>

125	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	24	37/183	5.93/85.07	6.4/94.9	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
126	Gelsolina (fragment)	GSN	P20305	14	26/133	5.93/85.07	6.5/95.1	CP CS EX	<i>Sus scrofa</i>
127	Caldesmon isoform X10	CALD1	XP_020934831	16	27/116	6.04/62.29	6.2/87.3	CS	<i>Sus scrofa</i>
128	Caldesmon isoform X10	CALD1	XP_020934831	22	35/147	6.04/62.29	6.3/86.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
129	Ezryna	EZR	XP_013847913	28	35/185	5.79/69.50	6.3/87.4	CMC S CP	<i>Sus scrofa</i>
130	Caldesmon isoform X10	CALD1	XP_020934831	14	25/137	6.04/62.29	6.4/86.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
131	Czynnik B dopełniacza	CFB	ABX82825	11	21/96	7.45/87.24	6.7/101.9	EX	<i>Sus scrofa</i>
132	Izoforma 1 czynnika elongacyjnego 2	EEF2	XP_003354050	15	20/109	6.41/96.26	7.0/99.1	CP	<i>Sus scrofa</i>
133	Izoforma 1 czynnika elongacyjnego 2	EEF2	XP_003354050	14	25/99	6.41/96.26	7.2/99.1	CP	<i>Sus scrofa</i>
134	Winkulina	VCL	P26234	32	31/217	5.62/124.44	7.7/107.7	CS	<i>Sus scrofa</i>
135	Serotransferyna	TF	P09571	23	35/169	6.93/78.97	6.7/85.0	EX	<i>Sus scrofa</i>
136	Serotransferyna	TF	P09571	43	66/431	6.93/78.97	6.8/85.3	EX	<i>Sus scrofa</i>
137	Serotransferyna	TF	P09571	40	62/425	6.93/78.97	6.9/83.9	EX	<i>Sus scrofa</i>
138	Serotransferyna	TF	P09571	46	69/475	6.93/78.97	7.0/84.3	EX	<i>Sus scrofa</i>
139	Serotransferyna	TF	P09571	39	61/328	6.93/78.97	7.2/84.7	EX	<i>Sus scrofa</i>
140	Izoforma 1 moezyny	MSN	XP_013841673	24	35/157	6.18/68.02	6.7/82.1	CM CP, CS	<i>Sus scrofa</i>
141	Izoforma 1 moezyny	MSN	XP_013841673	42	48/268	6.18/68.02	6.8/81.8	CM CP, CS	<i>Sus scrofa</i>

142	Prelamina A/C	LMNA	Q3ZD69	38	53/320	6.73/74.40	6.9/80.8	N	<i>Sus scrofa</i>
143	Prelamina A/C	LMNA	Q3ZD69	37	56/333	6.73/74.40	7.1/80.3	N	<i>Sus scrofa</i>
144	Mitochondrialny precursor hydratazy akonitanowej	ACO2	NP_999119	23	33/178	8.24/86.45	7.7/89.5	MT	<i>Sus scrofa</i>
145	Serotransferyna	TF	P09571	42	62/424	6.93/78.97	7.7/84.2	EX	<i>Sus scrofa</i>
146	Prelamina A/C	LMNA	Q3ZD69	25	41/216	6.73/74.40	7.6/81.0	N	<i>Sus scrofa</i>
147	Białko 1B szoku cieplnego 70 kDa	HSPA1B	Q6S4N2	33	62/307	5.60/70.34	6.0/76.1	CP, ER, MT, N	<i>Sus scrofa</i>
148	Albumina surowicza	ALB	P08835	16	29/96	6.08/71.64	6.1/74.9	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>
149	Albumina surowicza	ALB	P08835	27	51/215	6.08/71.64	6.1/73.5	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>
150	Albumina surowicza	ALB	P08835	30	55/326	6.08/71.64	6.2/72.4	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>
151	Albumina surowicza	ALB	P08835	36	63/351	6.08/71.64	6.3/72.3	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>
152	Albumina surowicza	ALB	P08835	31	54/306	6.08/71.64	6.4/72.7	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>
153	Podjednostka theta białka 1 kompleksu T	CCT8	XP_003358947	21	41/186	5.40/60.16	5.9/70.2	CP	<i>Sus scrofa</i>
154	C-type lectin domain family 10 member A	Clec10a	P49300	6	14/66	5.36/35.03	6.0/72.8	EX	<i>Mus musculus</i>
155	Syntaza 1 fosforanu-3-inozytolu	ISYNA1	Q2NL29	8	13/66	5.68/61.29	6.0/70.0	CP	<i>Bos taurus</i>
156	Białko podobne do fosfoglukomutazy 5	PGM5	XP_003121981	13	23/106	6.77/62.66	6.8/67.3	CP	<i>Sus scrofa</i>
157	Prelamina A/C	LMNA	Q3ZD69	13	18/82	6.73/74.44	6.8/68.5	N	<i>Sus scrofa</i>
158	Izoforma 1 B-2 glikoproteiny 1	APOH	XP_003131314	9	34/88	8.43/39.56	7.3/62.0	EX	<i>Sus scrofa</i>
159	Albumina surowicza	ALB	P02769	8	13/76	5.82/71.24	7.3/57.7	CP, EX	<i>Sus scrofa</i>

160	Aneksyna A2	ANXA2	P19620	17	57/200	6.49/38.76	7.2/38.0	CMC P	<i>Sus scrofa</i>
161	Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	P18669	8	45/116	6.67/28.90	7.1/30.5	CP	<i>Homo sapiens</i>
162	Izomeraza triozofosforanowa 1	TPI1	BAI48105	9	54/121	6.54/26.88	7.2/29.1	CP	<i>Sus scrofa</i>
163	Dehydrogenaza rybosyldihydronikotynamidu [chinon]	NQO2	XP_020955773	7	46/80	6.12/26.33	6.4/29.3	CP, N	<i>Sus scrofa</i>
164	Peroksyredoksyna 6	PRDX6	NP_999573	7	34/97	5.73/25.08	6.2/30.1	L	<i>Sus scrofa</i>
165	Izoforma 8 kinazy pirogronianowej PKM	PKM	XP_001929104	13	29/101	7.96/58.41	9.0/64.2	CP, MT	<i>Sus scrofa</i>
166	Aktyna alfa mięśnia szkieletowego	ACTA1	P68137	11	46/81	5.23/42.37	5.5/47.3	CS	<i>Sus scrofa</i>
167	Częściowa beta aktyna	ACTB	ACJ53775	7	40/82	5.26/33.93	5.6/46.4	CS	<i>A. ansorgej</i>
168	Aktyna alfa mięśnia szkieletowego	ACTA1	P68137	9	42/69	5.23/42.37	5.8/47.8	CS	<i>Sus scrofa</i>
169	Aktyna alfa mięśnia szkieletowego	ACTA1	P68137	11	42/77	5.23/42.37	6.0/48.5	CS	<i>Sus scrofa</i>
170	Heterogenna jądrowa rybonukleoproteina H	HNRNPH1	P31943	6	27/66	5.89/49.48	6.9/60.3	N	<i>Homo sapiens</i>
171	Białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3	PDIA3	Q4VIT4	8	23/64	6.23/57.14	6.9/64.4	ER	<i>C. aethiops</i>
172	Białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3	PDIA3	Q4VIT4	8	20/62	6.23/57.14	6.7/60.5	ER	<i>Sus scrofa</i>
173	Inhibitor beta dysocjacji GDP specyficzny dla białek Rho	GDI2	Q6Q7J2	13	37/84	6.31/50.75	6.2/57.6	CP, AG	<i>Sus scrofa</i>
174	Białko szoku cieplnego A8	HSPA8	P19378	7	25/71	5.24/70.99	5.9/70.1	N	<i>C. griseus</i>
175	Albumina surowicza	ALB	P08835	10	25/72	6.08/71.64	5.2/68.9	CP,E X	<i>Sus scrofa</i>
176	Białko macierzy zewnątrzkomórkowej zawierającej EGF, podobne do fibuliny 1	EFEMP1	XP_013851600	12	29/81	5.16/52.30	5.2/68.1	EX	<i>Sus scrofa</i>
177	Prekursor kalretikuliny	CALR	NP_001167604	10	29/83	4.32/48.43	4.7/63.6	ER	<i>Sus scrofa</i>

178	Izoforma 1 retikulokalbiny 2	RCN2	XP_005656339	10	34/96	4.22/36.70	4.2/52.7	ER	<i>Sus scrofa</i>
179	Izoforma 3 winkuliny	VCL	XP_005671131	22	31/121	5.83/117.25	6.4/104.4	CS	<i>Sus scrofa</i>

Wykaz tabel

Tabela 1. Skład diety w trzech grupach żywieniowych; grupa K – kontrola, grupa D1 – eksperymentalna z 2% dodatkiem wodnego wyciągu inuliny, grupa D2 – eksperymentalna z 4% dodatkiem suszu z korzenia cykorii.	42
Tabela 2. Skład buforów do równoważenia pasków IPG.	44
Tabela 3. Lista białek aorty rosnących prosiąt wykazujących różnice w ekspresji pod wpływem suplementacji diety inuliną i/lub suszem z korzenia cykorii. Numery spotów odpowiadają numerom na mapie z rys. 3-6. Dla każdego białka, na podstawie bazy danych (UniProt/NCBI), podano jego nazwę, nazwę genu, stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej oraz teoretyczną masę (MW) i punkt izoelektryczny (pI). W tabeli zawarto również wartości eksperymentalne MW i pI. Kolumny gr D1/K i gr D2/K- porównanie ekspresji wskazanych białek w grupie D1 (2% dodatku wodnego wyciągu inuliny) i grupie D2 (4% dodatku suszu z korzenia cykorii) w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości <1 oznaczają obniżenie ekspresji (kolor zielony) natomiast wartości >1 wskazują na wzrost ekspresji (kolor czerwony) danego białka. Wyniki istotne statystycznie, na poziomie $p \leq 0,05$ zostały wytluszczone.	61
Tabela A Charakterystyka zidentyfikowanych białek aorty rosnących prosiąt. Numery spotów odpowiadają numerom na mapie z rys 3-6. Dla każdego białka, na podstawie bazy danych (UniProt/NCBI), podano jego nazwę genu, numer akcesyjny, ilość dopasowanych peptydów, stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej, teoretyczną masę (MW) i punkt izoelektryczny, lokalizację komórkową oraz organizm, któremu zostało przypisane zidentyfikowane białko. W tabeli zamieszczono również wartości eksperymentalne MW i pI. Białka opisane nazwą w języku angielskim nie posiadają odpowiednika polskiej nazwy. Skróty: LK – lokalizacja komórkowa; CP – cytoplazma, ER – retikulum endoplazmatyczne; L – lizosomy; EX – macierz zewnątrzkomórkowa; MT – mitochondrium; N – jądro komórkowe; CS – cytoszkielet; AG – aparat Golgiego; S – synapsy; CM - błona komórkowa.	118

Wykaz rysunków

Rysunek 1. Najczęściej stosowane strategie analityczne wykorzystywane w badaniach proteomicznych (Marynowska i wsp., 2017).	19
Rysunek 2. Przykładowy żel 2-D reprezentujący profil białkowy aorty rosnących prosiąt (Białka zostały rozdzielone w zakresie pH 3-10 oraz zakresie masy molekularnej 10-250 kDa). Mapa została podzielona na 4 części.	48
Rysunek 3. Fragment A żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.	49
Rysunek 4. Fragment B żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.	49
Rysunek 5. Fragment C żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.	50
Rysunek 6. Fragment D żelu 2-D reprezentujący profil białkowy aorty przedstawiony na rysunku 2. Zidentyfikowane spoty białkowe oznaczone są numerami, które odpowiadają numerom białek zamieszczonym w tabeli A.	50
Rysunek 7. Zestawienie porównawcze eksperymentalnych i teoretycznych mas molekularnych białek zidentyfikowanych w aorcie rosnących prosiąt.	52
Rysunek 8. Zestawienie porównawcze eksperymentalnych i teoretycznych wartości punktów izoelektrycznych białek zidentyfikowanych w aorcie rosnących prosiąt.	53
Rysunek 9. Lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych białek aorty prosiąt na podstawie analizy bioinformatycznej z zastosowaniem programu Euk-mPlock 2.0.	54
Rysunek 10. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty wg uczestnictwa w procesach biologicznych z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.	56
Rysunek 11. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty ze względu na pełnioną funkcję molekularną z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.	57
Rysunek 12. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek aorty wg uczestnictwa w szlakach metabolicznych z zastosowaniem programu bioinformatycznego STRING v10.	58

Rysunek 13. Lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych białek aorty prosiąt, które charakteryzują się zmienioną ekspresją na podstawie analizy bioinformatycznej z zastosowaniem programu Euk-mPlock 2.0.	60
Rysunek 14. Średnie stężenie cholesterolu w aorcie prosiąt w trzech grupach żywieniowych. Na rysunku oznaczono średnie wartości oraz odchylenie standardowe w każdej z grup żywieniowych.	63
Rysunek 15. Średnie stężenie trójglicerydów w aorcie prosiąt w trzech grupach żywieniowych. Na rysunku oznaczono średnie wartości oraz odchylenie standardowe w każdej z grup żywieniowych.	64
Rysunek 16. Wpływ suplementacji diety inuliną i/lub suszem z korzenia cykorii na zmiany proteomu aorty rosnących prosiąt. Skróty: KKT – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe.	89