

**Dr Anna Kozłowska**

Katedra Fizjologii Człowieka

Wydział Lekarski

Collegium Medicum

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Al. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn

Tel: 89-523-53-11

Email: kozłowska.anna@uwm.edu.pl

**Załącznik 1**

## **AUTOREFERAT**

### **opis dorobku i osiągnięć naukowych**

Olsztyn 2018

**1. IMIĘ I NAZWISKO** Anna Kozłowska**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**2003**      **Magister zootechniki**, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł pracy magisterskiej: „*Wpływ fitoestrogenów na wydzielanie testosteronu przez komórki steroidogenne jąder gąsiorów rasy biłgorajskiej z uwzględnieniem sezonowości w rozrodzie*”, wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt pod kierunkiem prof. dr hab. Luizy Duszy.

**2009**      **Doktor nauk rolniczych** w dyscyplinie zootechnika, nadany uchwałą Rady Naukowej, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie; na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. „*Unierwienie i aktywność steroidogenna torbielowatych jajników świń*”; Promotor: dr hab. Barbara Jana; Recenzenci: prof. dr hab. Jerzy Kaleczyc, prof. dr hab. Adam Zięćnik.

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH**

10/01/2003-      **Asystent**, Zakład Patologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań  
07/11/2008      Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, Polska  
12/11/2008-      **Specjalista**, Katedra Fizjologii Człowieka, Wydział Nauk Medycznych,  
31/01/2010      Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska  
01/02/2010-      **Specjalista naukowo-techniczny**, Katedra Fizjologii Człowieka, Wydział  
14/03/2011      Nauk Medycznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska  
15/03/2011-      **Adiunkt**, Katedra Fizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet  
obecnie      Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska

#### 4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(zgodnie z przepisami ustawodawczymi: Ustawa z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki Art.16 ust.2 Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.)

Moim osiągnięciem, będącym podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, są wyniki badań opisane w 4 oryginalnych pracach naukowych z lat 2017-2018 ujętych pod wspólnym tytułem:

##### A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Podobieństwa i różnice w kodowaniu chemicznym neuronów somato- i trzewno-sensorycznych na przykładzie komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę świni

##### B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(pod każdym artykułem podano liczbę punktów MNiSW zgodnie z Komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 9 grudnia 2016 oraz współczynnik wpływu (IF) według Journal Citation Reports®, Thomson Reuters zgodnie z rokiem publikacji)

Liczba publikacji	4
Sumaryczny IF (zgodnie z rokiem publikacji)	10,616
Sumaryczna punktacja MNiSW (zgodnie z rokiem publikacji)	100

1. **Kozłowska A**, Mikołajczyk A, Adamiak Z, Majewski M. *Distribution and chemical coding of sensory neurons innervating the skin of the porcine hindlimb*. Neuropeptides 2017, 61: 1-14.

**Punktacja IF:** 2,915

**Punktacja ministerstwa:** 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1/ sformułowaniu problemu badawczego, 2/ opracowaniu metodyki badań, 3/ samodzielnym przeprowadzeniu procedury utrwalenia, krojenia i wybarwienia materiału, 4/ samodzielnym pozyskaniu wyników, 5/ samodzielnej analizie i interpretacji wyników, 6/ przygotowaniu pracy do druku oraz 7/ pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.

Mój udział procentowy szacuję na: 70%\*

2. **Kozłowska A**, Mikołajczyk A, Majewski M. *Detailed characterization of sympathetic chain ganglia (SCbG) neurons supplying the skin of the porcine hindlimb*. Int. J. Mol. Sci. 2017, 18(7). pii: E1463.

**Punktacja IF:** 3,687

**Punktacja ministerstwa:** 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1/ sformułowaniu problemu badawczego, 2/ opracowaniu metodyki badań, 3/ samodzielnym przeprowadzeniu procedury utrwalenia, krojenia i wybarwienia materiału, 4/ samodzielnym pozyskaniu wyników, 5/ samodzielnej analizie i interpretacji wyników, 6/ przygotowaniu pracy do druku oraz 7/ pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.

Mój udział procentowy szacuję na: 80%\*

**3. Kozłowska A,** Mikołajczyk A, Majewski M. *Distribution and neurochemistry of porcine urinary bladder-projecting sensory neurons in subdomains of the dorsal root ganglia: A quantitative analysis.* Ann. Anat. 2018, 216: 36-51.

**Punktacja IF:** 1,852

**Punktacja ministerstwa:** 30

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1/ sformułowaniu problemu badawczego, 2/ opracowaniu metodyki badań, 3/ samodzielnym przeprowadzeniu procedury utrwalenia, krojenia i wybarwienia materiału, 4/ samodzielnym pozyskaniu wyników, 5/ samodzielnej analizie i interpretacji wyników, 6/ przygotowaniu pracy do druku oraz 7/ pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.*

*Mój udział procentowy szacuję na: 80%\**

**4. Kozłowska A,** Mikołajczyk A, Majewski M. *Neurochemical difference between somato- and viscer-projecting sensory neurons in the pig.* J. Chem. Neuroanat. 2018, 94: 8-20.

**Punktacja IF:** 2,162

**Punktacja ministerstwa:** 20

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1/ sformułowaniu problemu badawczego, 2/ opracowaniu metodyki badań, 3/ samodzielnym przeprowadzeniu procedury utrwalenia, krojenia i wybarwienia materiału, 4/ samodzielnym pozyskaniu wyników, 5/ samodzielnej analizie i interpretacji wyników, 6/ przygotowaniu pracy do druku oraz 7/ pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.*

*Mój udział procentowy szacuję na: 80%\**

\*Oświadczenia współautorów publikacji oraz określenie indywidualnego wkładu pracy każdego z nich znajdują się w **Załączniku 7**.

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

Wybrane prace stanowią cykl publikacji opisujących rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów współczulnych oraz somato- i trzewno-sensorycznych zaopatrujących pęcherz moczowy lub skórę. Prace te obrazują ponadto podobieństwa i różnice w rozmieszczeniu i kodowaniu chemicznym omawianych subpopulacji komórek nerwowych.

#### **Wprowadzenie**

Powszechnie wiadomo, że zarówno ściana pęcherza moczowego, jak i skóra unerwione są przez autonomiczny układ nerwowy (neurony współczulne i przywspółczulne) oraz odpowiednio trzewne bądź somatyczne neurony czuciowe (Roosterman i wsp. 2006; de Groat i wsp. 2015). Obie komponenty wywierają istotny wpływ na funkcję tych narządów poprzez regulację licznych procesów fizjologicznych, które w nich zachodzą. W przypadku pęcherza moczowego procesy te są związane m.in. z gromadzeniem, a następnie okresowym wydalaniem moczu (Brading 1999), podczas gdy w skórze procesy te dotyczą głównie regulacji przepływu krwi przez skórne naczynia krwionośne (Charkoudian 2003).

Z przeglądu literatury wynika, że wzór unerwienia pęcherza moczowego i skóry tylnej kończyny został zbadany głównie u gryzoni laboratoryjnych (Moss i wsp. 1990; Roth i Kummer 1994; Zhou i Ling 1998, Yoshimura i de Groat 1999; Ruocco i wsp. 2002; Zvarova i wsp. 2004), a także u kota (Jänig i Kümmel 1981; Wakabayashi i wsp. 1995), psa (Mark i wsp. 1972; Stief i wsp. 1990;) oraz świni (Bossowska i wsp. 2009; Debeer i wsp. 2013; Russo

i wsp. 2013; Pidsudko 2014). Stwierdzono, że unerwienie tych narządów pochodzi z wielu źródeł. W przypadku pęcherza moczowego wykazano, że włókna afferentne pochodzą z rdzeniowych zwojów czuciowych (Zvarova i wsp. 2004), podczas gdy włókna współczulne biorą swój początek w zwojach pnia współczulnego (SChG) oraz zwojach kręzkowych tylnych (Vera i Nadelhaft 1992). Z kolei, włókna przywspółczulne pochodzą zarówno ze śródściennych zwojów trójkąta pęcherza moczowego (Smet i wsp. 1996; Pidsudko 2004), jak i zwoju przyszyjkowego (Mitchell i wsp. 1993). Wykazano ponadto, że włókna nerwowe reprezentujące poszczególne komponenty są zlokalizowane w warstwie mięśniowej, podśluzówkowej, nabłonku dróg moczowych oraz wokół naczyń krwionośnych na terenie ściany pęcherza moczowego (Lepiarczyk i wsp. 2017). W przypadku unerwienia skóry kończyny tylnej wykazano, że są to włókna nerwowe pochodzące głównie z rdzeniowych zwojów czuciowych (Takahashi i wsp. 2003; Minett i wsp. 2014) i SChG (Lindh i wsp. 1989), które unerwiają skórę właściwą, naczynia krwionośne i limfatyczne, zespolenia tętniczko-żylny, mięśnie przywłosowe, gruczoły apo- i ekkrynowe, a także mieszki włosowe (Hsieh i wsp. 1997; Vetrugno i wsp. 2003).

Liczne badania wykazały w neuronach i włóknach nerwowych tworzących poszczególne komponenty obwodowego układu nerwowego obecność wielu substancji biologicznie aktywnych, pełniących funkcję neuroprzekazników. Co więcej, mogą one występować w tych strukturach pojedynczo lub w kolokalizacji z innymi substancjami, które wówczas noszą miano ko-transmiterów (Romei i wsp. 2016). Obecność „pakietu” substancji we włóknie nerwowym lub komórce nerwowej określana jest jako kodowanie chemiczne tej struktury. Taka różnorodność współwystępowania substancji w tej samej strukturze nerwowej umożliwia ich różne sposoby oddziaływania na tkanki i narządy docelowe (Furness i wsp. 1989). Liczne analizy wykazały np., że we włóknach czuciowych najczęściej występującymi neuroprzekaznikami są substancja P i peptyd kodowany genem kalcytoniny (Ruscheweyh i wsp. 2007); we włóknach współczulnych dominują katecholaminy oraz neuropeptyd Y (Warburton i Santer 1994), a we włóknach przywspółczulnych głównym neurotransmiterem jest acetylocholina i/lub tlenek azotu (Persson i wsp. 1995) lub inne neuropeptydy (Zhou i Ling 1998).

W celu precyzyjnej lokalizacji neuronów zaopatrujących badany narząd lub strukturę często stosuje się technikę znakowania wstecznego neuronów z użyciem różnych znaczników, takich jak Fast Blue (FB; Hayashi i wsp. 2007), Fluoro Gold (Naumann i wsp. 2000) i Fluoro Ruby (Hayashi i wsp. 2007). Warto nadmienić, iż właśnie w Katedrze Fizjologii Człowieka Wydziału Lekarskiego UWM w Olsztynie od 10 lat prowadzone są intensywne prace badawcze mające na celu określenie źródeł pochodzenia włókien nerwowych zaopatrujących poszczególne struktury pęcherza moczowego samicy świni oraz ocenę stopnia plastyczności obwodowego układu nerwowego pod wpływem różnych toksyn podawanych do tego narządu (Bossowska i wsp. 2009; Bossowska i wsp. 2015; Lepiarczyk i wsp. 2015). Zmiany kodowania chemicznego (plastyczność) poszczególnych subpopulacji komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy (zawierających znacznik FB) analizuje się najczęściej przy użyciu pojedynczych i/lub podwójnych barwień immunofluorescencyjnych.

Dotychczas przeprowadzone w Katedrze Fizjologii Człowieka Wydziału Lekarskiego UWM badania pozwoliły wykazać obecność 3 subpopulacji komórek nerwowych zlokalizowanych w DRG (Bossowska i wsp. 2009) i jedną w SChG (Lepiarczyk i wsp. 2015),

które zaopatrują pęcherz moczowy świni. Należy tutaj podkreślić, że proponowane badania, dotyczące komórek nerwowych pochodzących z DRG oraz SChG i zaopatrujących skórę kończyny tylnej świni, pozwoliły na poznanie ich rozmieszczenia w omawianych zwojach (somatotopii) oraz kodowania chemicznego. Jest to o tyle ważne, gdyż poszczególne typy komórek nerwowych (zwłaszcza czuciowych) zlokalizowanych w DRG i zaopatrujących pęcherz moczowy oraz skórę charakteryzuje odmienna funkcja. Wykazano np. u szczurów, że neurony posiadające włókna C mają małą średnicę ciała komórki, podczas gdy neurony posiadające włókna A- $\delta$  mają nieco większą średnicę i są nazywane neuronami DRG średniej wielkości (de Groat i Yoshimura 2009). Wykazano, że neurony pęcherza moczowego o małej średnicy przenoszą informacje związane z bólem z pęcherza do rdzenia kręgowego, a także mogą przejmować funkcję włókien A- $\delta$  (wykrywanie nie-nocyceptywnych bodźców, ciśnienia wypieracza, rozciągania, objętości) w dysfunkcjach pęcherza moczowego (de Groat i Yoshimura 2009; Mandge i Manchanda 2018).

W przypadku komórek nerwowych zaopatrujących skórę ich podział w zależności od funkcji jest bardziej złożony. W pierwszej kolejności możemy je podzielić na cztery główne podtypy: (a) nocyceptory - reagujące na bodźce uszkodzające tkankę; (b) pruriceptory - odpowiedzialne za odczuwanie swędzenia; (c) termoreceptory - rejestrujące informacje o temperaturze i (d) ogromna, dość heterogeniczna grupa mechanoreceptorów o niskim progu pobudliwości – odpowiedzialnych za odbiór bodźców dotykowych (McGlone i Reilly 2010). Jednakże każdy z tych fizjologicznie zdefiniowanych podzbiorów komórek nerwowych można dalej podzielić na różne funkcjonalnie podtypy biorąc pod uwagę ich cechy histologiczne i fizjologiczne m.in. średnicę ciała komórki nerwowej, średnicę aksonu, stopień mielinizacji, a także prędkość przewodzenia (Abraira i Ginty 2013). Przykładowo, komórki nerwowe o małej średnicy stanowią źródło śródskórnych włókien C (Smith i Lewin 2009). Ponieważ komórki te reagują na czynniki termiczne, chemiczne (ostry i przewlekły świąd), a także bodźce nocyceptywne, zostały nazwane komórkami polimorficznymi (Johnson 2008). Co więcej, rośnie liczba dowodów na to, że populacja włókien C odgrywa również kluczową rolę w przekazywaniu tak zwanych "bodźców przyjemności" generowanych podczas pielęgnacji ciała (McGlone i Reilly 2010; Zimmerman i wsp. 2014). Podsumowując powyższe dane, przyjmuje się, że zdecydowana większość komórek nerwowych o małej średnicy (i przynajmniej część o średniej wielkości) zaopatrujących skórę uczestniczy w procesie nocycepcji/pruricepcji oraz w odczuwaniu bodźców termicznych (Petruska i wsp. 2000; Djouhri i wsp. 2003). Tymczasem komórki nerwowe o dużej średnicy są głównie zaangażowane w mechano- i/lub propriocepcję (Le Pichon i Chesler 2014; Li i wsp. 2016).

Interesujący jest również fakt, że komórki nerwowe zaopatrujące trójkąt pęcherza moczowego świni pochodzące ze zwoju kręzkowego tylnego (Pidsudko 2000) oraz zaopatrujące kończynę tylną szczura pochodzące z DRG (Wessels i wsp. 1990), charakteryzowały się uporządkowanym rozmieszczeniem na terenie omawianych zwojów, co może świadczyć o ich somatotopowej organizacji.

Należy również podkreślić, iż niezwykle istotną kwestią jest to, że istnieją bardzo znaczące różnice w liczbie komórek nerwowych zaopatrujących poszczególne narządy (Chyczewski i wsp. 2006; Bossowska i wsp. 2009) oraz w ich kodowaniu chemicznym (Zhong i wsp. 2003; Malet i Brumovsky 2015). Przykładowo, wykazano, że u świni znajdowało się znacznie więcej komórek nerwowych zlokalizowanych w DRG, które zaopatrywały pęcherz moczowy (Bossowska i wsp. 2009) niż komórek nerwowych zaopatrujących mięsień

najdłuższy grzbietu (Chyczewski i wsp. 2006). Jak już wspomniano powyżej, różnice pomiędzy poszczególnymi narządami dotyczyły również kodowania chemicznego tych komórek nerwowych (wchodzących w skład DRG). Wykazano, m.in. różnice w częstotliwości występowania różnych podtypów pęcherzykowego transportera glutaminianu i receptora purynowego 2X w subpopulacji komórek nerwowych DRG, zaopatrujących pęcherz moczowy, skórę kończyny tylnej i/lub jelita (Zhong i wsp. 2003; Malet i Brumovsky 2015). Ponadto, komórki nerwowe zaopatrujące pęcherz moczowy wykazywały również istotne różnice w liczbie i kodowaniu chemicznym, kiedy porównano komórki zlokalizowane w DRG odcinka lędźwiowego do tych zlokalizowanych w DRG odcinka krzyżowego (Pidsudko 2014).

Przedstawione powyżej dane dotyczące unerwienia pęcherza moczowego i innych narządów wskazują na istotne różnice zarówno w ilości komórek nerwowych występujących w zwojach je zaopatrujących, jak i ich chemicznego kodowania. W związku z tym bardzo zasadne wydawało się poznanie zarówno wzorów dystrybucji jak i kodowania chemicznego komórek nerwowych DRG i/lub SChG, które zaopatrują pęcherz moczowy lub skórę kończyny tylnej świni w celu uzyskania wielu danych dotyczących potencjalnej roli i wpływu tych komórek na funkcję obu tych narządów. Natomiast kolejny etap miał na celu wykazanie podobieństw i różnic w dystrybucji i kodowaniu chemicznym czuciowych komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę świni. Ponadto, należy tu podkreślić zasadność użycia w prezentowanym cyklu prac świni domowej (łac. *Sus scrofa domestica*) jako zwierzęcia doświadczalnego. Świnia domowa wykazuje wyraźne anatomiczne, fizjologiczne, biochemiczne i immunologiczne podobieństwa do ludzi (Avon i Wood 2005). Dlatego jest szczególnie cennym gatunkiem wykorzystywanym do badań chorób różnych narządów m.in. pęcherza moczowego i skóry u ludzi (Herron 2009; Parsons i wsp. 2012). Co więcej, wykazano, że pęcherz moczowy świni charakteryzuje się również wyraźnym podobieństwem do ludzkiego pęcherza zarówno pod względem strukturalnym, jak i urodynamicznym (Crowe i Burnstock 1989; Teufl i wsp. 1997; Mills i wsp. 2000; Moore i Brading 2007). W przypadku skóry świni organizacja jej unerwienia nie jest jeszcze w pełni poznana mimo to jest ona często stosowana jako model do badania mechanizmu bólu skórno-skórnego, gojenia się ran oraz poparzeń, a także wpływu promieniowania i ekspozycji na promieniowanie laserowe (Sullivan i wsp. 2001; Levi i wsp. 2011; Di Giminiani i wsp. 2013; Kim i wsp. 2013). Pomimo ciągłego wzrostu znaczenia świni jako zwierzęcia laboratoryjnego w badaniach biomedycznych (Swindle i wsp. 1992), wiedza dotycząca zarówno dystrybucji jak i kodowania chemicznego zwojów zaopatrujących pęcherz moczowy jest niekompletna, a w przypadku skóry szczątkowa.

### **Cel badań**

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, głównymi założeniami podjętej serii badań była próba odpowiedzi na następujące pytania: (a) Jak wygląda wzór dystrybucji oraz kodowania chemicznego neuronów czuciowych i współczulnych zaopatrujących skórę kończyny tylnej świni?; (b) Jak wygląda dokładny wzór dystrybucji oraz kodowania chemicznego neuronów czuciowych zaopatrujących pęcherz moczowy świni?; Czy rozmieszczenie tych komórek na terenie DRG jest zorganizowane somatotopowo?; (c) Czy występują podobieństwa i różnice w dystrybucji i kodowaniu chemicznym komórek nerwowych pomiędzy populacją zaopatrującą pęcherz moczowy i skórę kończyny tylnej świni?

W związku z tym zaplanowano:

**Cel 1** Określenie źródła pochodzenia unerwienia czuciowego skóry kończyny tylnej oraz zbadanie rozmieszczenia i kodowania chemicznego tych komórek nerwowych oraz porównanie uzyskanych wyników z DRG części lędźwiowej z tymi uzyskanymi w DRG części krzyżowej (**Publikacja 1**).

**Cel 2** Określenie źródła pochodzenia unerwienia współczulnego skóry kończyny tylnej oraz zbadanie rozmieszczenia tych komórek nerwowych i ich kodowania chemicznego (**Publikacja 2**).

**Cel 3** Szczegółowe zbadanie rozmieszczenia i kodowania chemicznego komórek nerwowych pochodzących z poszczególnych DRG części krzyżowej i zaopatrujących pęcherz moczowy oraz porównanie uzyskanych wyników z poszczególnych DRG (**Publikacja 3**).

**Cel 4** Porównanie podobieństw i różnic w dystrybucji i kodowaniu chemicznym czuciowych komórek nerwowych zlokalizowanych w DRG części krzyżowej i zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę kończyny tylnej świni (**Publikacja 4**).

### **Materiał i metody**

Badania przeprowadzono na samicach świni domowej o wadze 15-20 kg. Zwierzęta podzielone były na grupę zwierząt, którym podano znacznik fluorescencyjny Fast Blue (FB) do ściany pęcherza moczowego (grupa I) oraz grupę zwierząt, którym podano FB w skórę kończyny tylnej (grupa II). W grupie I i II, podczas operacji przeprowadzonej w narkozie, wstrzyknięto zwierzętom odpowiednio w ścianę pęcherza moczowego i śródskórną 5% zawiesinę FB w całkowitej objętości 100 $\mu$ l. Należy podkreślić, że w przypadku pęcherza moczowego było to 25 wstrzyknięć (2 $\mu$ l) wykonanych w każdą połowę ściany pęcherza (od wierzchołka do podstawy pęcherza), podczas gdy w przypadku skóry wykonano 50 wstrzyknięć (1 $\mu$ l) w obszarze unerwionym przez skórne gałęzie nerwu udowego (50 $\mu$ l) i kolejne 50 (1 $\mu$ l) w obszarze nerwu kulszowego (50 $\mu$ l). Po upływie 2 tygodni w grupie I i po upływie 4 tygodni w grupie II zwierzęta zostały powtórnie wprowadzone w stan narkozy, a następnie uśmiercone i poddane perfuzji transkardiakalnej z użyciem 4% zbuforowanego roztworu paraformaldehydu (pH 7,4). U świń w grupie I, pobrano zwoje DRG (n=5; L<sub>1</sub>-C<sub>q2</sub>), podczas gdy w grupie zwierząt II pobrano zwoje DRG (n=4; Th<sub>12</sub>-S<sub>4</sub>) oraz SChG (n=4; Th<sub>12</sub>-S<sub>4</sub>). Pobrany materiał dotrwalano przez 15 minut w tym samym roztworze, który został użyty do perfuzji. Następnie pobrane zwoje płukano w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4, 4°C) przez kolejne 3 dni. Po tym czasie materiał został umieszczony w 18% roztworze sacharozy w celu jego odwodnienia, a tym samym krioprotekcji. Następnie, wszystkie zwoje zostały pokrojone za pomocą kriostatu (HM525 Zeiss, Niemcy) na seryjne skrawki mrożeniowe o grubości 10 $\mu$ m, które były przechowywane w -21°C w celu przeprowadzenia dalszych analiz. Pierwszą analizą, której poddano skrawki mrożeniowe było określenie przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego zwojów stanowiących źródło zaopatrzenia pęcherza moczowego i skóry. Wyselekcjonowane w ten sposób szkiełka podstawowe ze skrawkami (4 na każdym szkiełku) zostały poddane kolejnej analizie, która polegała na policzeniu na co czwartym skrawku (w celu uniknięcia liczenia tej samej komórki dwa razy) liczby komórek FB-pozytywnych z widocznym jądrem w celu określenia reprezentatywnej liczby komórek nerwowych zaopatrujących dany narząd. Następnie wybrane szkiełka podstawowe zostały poddane pojedynczym i/lub podwójnym barwieniom immunofluorescencyjnym z wykorzystaniem komercyjnych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym substancjom biologicznie aktywnym. W doświadczeniu wykorzystano



przeciwciała pierwotne skierowane przeciwko białku jądrowemu specyficznemu dla dojrzałych neuronów (NeuN; ang: *Neuronal Nuclei Antigen*),  $\beta$ -hydroksylazie tyrozyny (DBH), galaninie (GAL), izolektyynie B4 (IB4), kalbindynie-D28k (CB), leu5-enkefalinie (LENK), naczynioaktywnemu peptydowi jelitowemu (VIP), neurofilamentowi 200 (NF200), neuropetydowi Y (NPY), peptydowi kodowanemu genem kalcytoniny (CGRP), polipeptydowi aktywującemu przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP), receptorowi waniloidowemu 1 (TRPV1), somatostatynie (SOM), substancji P (SP) oraz syntetazie tlenu azotu (nNOS). Użycie gatunkowo specyficznych przeciwciał wtórnych sprzężonych z odpowiednimi fluorochromami (biotyna+CY3, FITC, Alexa) pozwoliło na wykonanie podwójnych barwień immunofluorescencyjnych. Wybarwione preparaty zostały częściowo sfotografowane i poddane analizie przy zastosowaniu technik mikroskopii epifluorescencyjnej (Olympus BX61) i konfokalnej (Zeiss LSM 710). W celu określenia procentowego udziału danej subpopulacji komórek nerwowych (małe, średnie i duże) zawierających badaną kombinację antygenów liczono wszystkie komórki nerwowe FB-pozytywne z widocznym jądrem komórkowym dla każdej kombinacji surowic. Procent ten był ustalany w stosunku do wszystkich policzonych FB-pozytywnych komórek nerwowych. Następnie uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem testu U Manna-Whitneya (dwie zmienne) i/lub jednoczynnikowej analizy wariancji (test Tukeya, 3 lub więcej zmiennych) (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Dokładniejsze informacje dotyczące opisu procedury pobierania, utrwalania i barwienia pobranych zwojów oraz analizy uzyskanych wyników zostały zawarte w poszczególnych pracach stanowiących składowe szczególne osiągnięcia naukowego.

W badaniach zastosowano następujące metody badawcze:

- 1) Technikę znakowania wstecznego neuronów z użyciem znacznika fluorescencyjnego FB, który wprowadzony do tkanek jest pobierany przez zakończenia nerwowe znajdujące się w tkance i transportowany wstecznym transportem aksonalnym do ciała komórki nerwowej. FB gromadzi się w komórce nerwowej i może być łatwo wykryty nawet po upływie 6 miesięcy od jego podania przy pomocy filtra UV, w który są wyposażone mikroskopy fluorescencyjne.
- 2) Techniki morfometryczne, które pozwoliły na precyzyjne określenie rozmieszczenia oraz parametrów morfometrycznych komórek nerwowych zlokalizowanych w DRG i SChG.
- 3) Immunohistochemię fluorescencyjną, która pozwoliła na zdefiniowanie kodowania chemicznego wyznakowanych subpopulacji komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę kończyny tylnej.

## Wyniki

Badania niniejsze wykazały, że skóra kończyny tylnej zaopatrywana jest przez zorganizowane somatotopowo komórki nerwowe DRG (**Cel 1, Publikacja 1**) i SChG (**Cel 2, Publikacja 2**) z części lędźwiowej i krzyżowej. Co więcej, wykazano różnice w rozmieszczeniu tych komórek na terenie omawianych zwojów oraz w ich kodowaniu chemicznym (**Cel 1 i 2, Publikacja 1 i 2**). Różnice te były szczególnie widoczne wówczas, gdy porównano DRG części lędźwiowej do DRG części krzyżowej (**Cel 1, Publikacja 1**) lub SChG w obrębie odcinków lędźwiowych i krzyżowych (**Cel 2, Publikacja 2**).

Ponadto, w odniesieniu do pęcherza moczowego wykazano istotne różnice w dystrybucji oraz kodowaniu chemicznym komórek nerwowych w poszczególnych DRG części krzyżowej ( $S_2$ ,  $S_3$  i  $S_4$ ) zaopatrujących ten narząd. Stwierdzono także, że większość komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy zlokalizowana jest w części centralnej DRG co może świadczyć o ich somatotopii (**Cel 3, Publikacja 3**). Z kolei, porównanie subpopulacji komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy z subpopulacją zaopatrującą skórę kończyny tylnej świni wykazało liczne podobieństwa, ale także i wyraźne różnice w ich dystrybucji oraz kodowaniu chemicznym (**Cel 4, Publikacja 4**), co świadczy o odmiennych funkcjach pełnionych przez te komórki.

### Omówienie wyników z Publikacji 1

Przeprowadzone badania wykazały, że:

a) źródłem unerwienia skóry kończyny tylnej świni są neurony DRG odcinka lędźwiowego ( $L$ ;  $L_4$ - $L_6$ ) oraz krzyżowego ( $S$ ;  $S_1$ - $S_3$ ). Co więcej, komórki FB-pozytywne były znacznie liczniejsze w DRG części krzyżowej ( $63,2 \pm 0,4\%$ ) niż lędźwiowej;

b) populacja komórek nerwowych zaopatrujących skórę kończyny tylnej składała się z trzech subpopulacji: komórki małe (średnia wielkość  $19,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ), średnie (średnia wielkość  $42,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) i duże (średnia wielkość  $65,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ).

c) wzór dystrybucji 3 subpopulacji komórek nerwowych DRG odcinka lędźwiowego ( $L_4$ - $L_6$ ) został powtórzony w DRG odcinka krzyżowego ( $S_1$ - $S_3$ ). Przykładowo w DRG odcinka  $L_4$  i  $S_1$  najliczniejszą populację stanowiły komórki nerwowe o małej średnicy, podczas gdy średnie i duże komórki nerwowe były znacznie mniej liczne ( $L_4$  -  $63,7 \pm 1,7\%$ ,  $33,4 \pm 1,9\%$ ,  $2,8 \pm 0,4\%$  i  $S_1$  -  $63,1 \pm 2,5\%$ ,  $32,1 \pm 2,3\%$ ,  $4,7 \pm 0,3\%$ ; odpowiednio). Z kolei, w DRG odcinka  $L_5$  odsetek komórek o małej średnicy był znacznie wyższy w porównaniu do komórek o średniej i dużej wielkości ( $L_5$  -  $51,6 \pm 2,2\%$ ,  $43,1 \pm 1,5\%$ ,  $5,2 \pm 0,4\%$ , odpowiednio). Tymczasem w DRG odcinka  $S_2$  odsetek komórek nerwowych o małej i średniej wielkości były podobny, ale znacznie wyższy od tego, który prezentowała subpopulacja dużych komórek ( $S_2$  -  $48,3 \pm 1,1\%$ ,  $45,2 \pm 0,9\%$ ,  $6,4 \pm 0,1\%$ , odpowiednio).

d) wzory dystrybucji komórek nerwowych w poszczególnych subdomenach (dogłowowo-obwodowa – cr-p, doogonowo-obwodowa – cd-p, dogłowowo-centralna – cr-c i doogonowo-centralna cd-c) różniły się w zależności od średnicy tych komórek. Wykazano m.in., że komórki nerwowe o małej średnicy występowały najliczniej w subdomenie cr-p ( $L_4$ - $L_6$  -  $39,5 \pm 1,0\%$ ,  $S_1$ - $S_3$  -  $37,5 \pm 2,3\%$ ) i cd-p ( $L_4$ - $L_6$  -  $32,7 \pm 1,0\%$ ;  $S_1$ - $S_3$  -  $35,3 \pm 1,2\%$ ). Z drugiej strony, najniższe wartości procentowe odnotowano w subdomenach cr-c ( $L_4$ - $L_6$  -  $13,1 \pm 0,8\%$ ,  $S_1$ - $S_3$  -  $13,6 \pm 0,5\%$ ) i cd-c ( $L_4$ - $L_6$  -  $14,5 \pm 0,4\%$ ;  $S_1$ - $S_3$  -  $13,5 \pm 2,2\%$ ). Natomiast rozmieszczenie komórek nerwowych o średniej i dużej wielkości było bardziej zróżnicowane.

e) małe, średnie i duże komórki nerwowe zaopatrujące skórę kończyny tylnej wykazywały immunoreaktywność dla SP, CGRP i PACAP. Szczególnie liczne były komórki nerwowe o małej średnicy zawierające SP (80%), CGRP (90%) lub PACAP (70%). Z kolei, komórki nerwowe o średniej wielkości rzadziej zawierały te substancje (SP - 40%, CGRP - 60% i PACAP - 55%). Tymczasem komórki o dużej średnicy zawierały SP, CGRP i PACAP sporadycznie. Interesujący jest fakt, że istnieją znaczne różnice pomiędzy różnymi subpopulacjami komórek nerwowych dotyczące obecności GAL, SOM, nNOS i CB pomiędzy DRG części lędźwiowej i krzyżowej rdzenia kręgowego. Przykładowo, odsetek komórek

nerwowych o średniej wielkości zawierających nNOS był znacząco wyższy w krzyżowych niż lędźwiowych DRG.

f) badane substancje często współwystępowały w tej samej komórce nerwowej. Wykazano m.in., że znaczna większość komórek nerwowych o małej średnicy zawierała SP jednocześnie z CGRP i/lub PACAP. Zbliżone wartości odnotowano w populacji średnich komórek nerwowych (wyjątek stanowiły komórki SP/PACAP-pozytywne, których było znacznie mniej). Co więcej, wśród komórek nerwowych o małej średnicy oraz komórek o średniej wielkości wykazano kolokalizację SOM z GAL lub CB, podczas gdy komórki nerwowe o dużej wielkości zawierające SOM bardzo rzadko wykazywały obecność pozostałych substancji. Niewielki odsetek komórek nerwowych o małej średnicy zawierających PACAP wykazywał również obecność GAL i nNOS. Wykazano także różnice w dystrybucji poszczególnych subpopulacji komórek porównując DRG z części lędźwiowej i krzyżowej.

Praca niniejsza to pierwsze kompleksowe opracowanie zawierające szczegółowy opis zarówno źródeł pochodzenia unerwienia skóry kończyny tylnej świni jak również wzorów dystrybucji i kodowania chemicznego neuronów zaopatrujących ten narząd. Nie istnieje według mojej wiedzy jakiegokolwiek inne opracowanie na ten temat. Dotychczas zbadano jedynie źródła unerwienia skóry kończyny tylnej u szczura, myszy lub kota (McLachlan i Jänig 1983; Takahashi i wsp. 2003; Barabas i Stucky 2013; Minett i wsp. 2014). Co więcej, badania dotyczące kodowania chemicznego neuronów czuciowych zaopatrujących skórę prowadzono jak dotąd głównie u szczura, myszy i świnki morskiej (Gibbins i wsp. 1985; Aoki i wsp. 2005; Suzuki i wsp. 2010). Badania te wykazały obecność SP i/lub CGRP, podczas gdy nie ma danych na temat PACAP i innych substancji.

## **Omówienie wyników z Publikacji 2**

Przeprowadzone badania wykazały, że:

- a) źródłem unerwienia współczulnego skóry kończyny tylnej świni są SChG odcinka lędźwiowego (L; L<sub>2</sub>-L<sub>6</sub>) oraz krzyżowego (S; S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>). Co więcej, komórki FB-pozytywne były znacznie liczniejsze w SChG części lędźwiowej ( $73,7 \pm 14,0\%$ ) niż krzyżowej.
- b) populacja komórek nerwowych zaopatrujących skórę kończyny tylnej składała się z dwóch subpopulacji: komórki małe ( $<25 \mu\text{m}$ ; średnia wielkość  $17,4 \pm 6,0 \mu\text{m}$ ) i duże ( $>25 \mu\text{m}$ ; średnia wielkość  $29,6 \pm 5,4 \mu\text{m}$ ).
- c) wzory dystrybucji komórek nerwowych w poszczególnych subdomenach (dogłowowo-grzbietowej – cr-do, dogłowowo-brzuszej – cr-ve, doogonowo-grzbietowej – ca-do, doogonowo-brzuszej – ca-ve) różniły się w zależności od średnicy badanych komórek. Wykazano, między innymi, że komórki nerwowe o małej średnicy występowały częściej w subdomenie cr-do ( $26,6 \pm 0,4\%$ ) niż w cr-ve ( $21,4 \pm 0,6\%$ ) SChG odcinka lędźwiowego. W SChG odcinka krzyżowego stwierdzono najwyższy odsetek komórek nerwowych o małej średnicy w subdomenie ca-do ( $32,0 \pm 1,9\%$ ), szczególnie w porównaniu do SChG odcinka lędźwiowego ( $24,6 \pm 0,9\%$ ). Wzory dystrybucji dużych komórek nerwowych w określonych subdomenach SChG odcinka lędźwiowego i krzyżowego były częściowo odmienne od obserwowanych w subpopulacji komórek nerwowych o małej średnicy. Przykładowo duże komórki nerwowe zlokalizowane w lędźwiowych i krzyżowych SChG

były znacznie bardziej liczne w subdomenie cr-do ( $33,3\pm 3,9\%$ ,  $36,2\pm 2,2\%$ ; odpowiednio) niż cr-ve ( $20,0\pm 1,9\%$ ,  $20,3\pm 2,6\%$ ; odpowiednio).

d) zawartość D $\beta$ H, markera neuronów współczulnych, w obu subpopulacjach komórek utrzymywała się na podobnym poziomie zarówno w SChG odcinka lędźwiowego, jak i krzyżowego (>80%).

e) małe i duże komórki nerwowe zaopatrujące skórę kończyny tylnej wykazywały immunoreaktywność dla D $\beta$ H oraz SOM, NPY, PACAP, LENK, SP, nNOS, VIP i GAL. Przykładowo, w populacji komórek nerwowych o małej średnicy wykazano, że komórki D $\beta$ H zawierające jednocześnie SOM, NPY i GAL występowały najliczniej w L<sub>4</sub>, zawierające D $\beta$ H/PACAP i D $\beta$ H/LENK w L<sub>5</sub>, podczas gdy komórki immunoreaktywne dla D $\beta$ H/VIP i D $\beta$ H/SP w L<sub>6</sub>. W odniesieniu do dużych komórek nerwowych wykazano, że neurony zawierające D $\beta$ H/nNOS należały do najliczniejszej populacji w L<sub>4</sub>, D $\beta$ H/PACAP, D $\beta$ H/VIP, D $\beta$ H/NPY, D $\beta$ H/LENK i D $\beta$ H/GAL w L<sub>5</sub> i D $\beta$ H/SOM i D $\beta$ H/SP w L<sub>6</sub>. Co więcej, zaobserwowano, że odsetek komórek nerwowych o małej średnicy, które wykazywały immunoreaktywność w kierunku D $\beta$ H/SOM i D $\beta$ H/NPY zmniejszał się w kierunku doogonowym. W przypadku komórek nerwowych o małej średnicy i zlokalizowanych w SChG odcinka krzyżowego wykazano jednoczesne współwystępowanie w tej samej komórce D $\beta$ H z nNOS lub GAL (najliczniej w S<sub>1</sub>), a także D $\beta$ H z PACAP, D $\beta$ H z SOM lub VIP (najliczniej w S<sub>2</sub>). Z kolei, komórki nerwowe o dużej wielkości wykazywały jednoczesną obecność D $\beta$ H z SOM lub VIP szczególnie w S<sub>1</sub> oraz obecność D $\beta$ H z PACAP lub nNOS szczególnie w S<sub>2</sub>.

f) kodowanie chemiczne komórek nerwowych różniło się istotnie w zależności od ich wielkości zarówno w SChG odcinka lędźwiowego, jak i krzyżowego. Przykładowo, w L<sub>5</sub> odsetek komórek nerwowych o małej średnicy zawierających D $\beta$ H i nNOS był wyższy niż dużych komórek o tym fenotypie. Z kolei, w S<sub>2</sub> częstotliwość występowania komórek nerwowych o małej średnicy, immunoreaktywnych wobec D $\beta$ H z PACAP, D $\beta$ H z SOM lub VIP, była wyższa w porównaniu z komórkami o dużych rozmiarach.

Jest to jak dotąd pierwsze opracowanie, które opisuje zarówno źródła pochodzenia unerwienia współczulnego skóry kończyny tylnej świni jak i wzory rozmieszczenia i kodowania chemicznego neuronów zaopatrujących ten narząd ze szczególnym uwzględnieniem SChG poszczególnych odcinków pnia współczulnego. Dotychczas określono źródła unerwienia współczulnego kończyny tylnej u człowieka i kota (McLachlan i Jänig 1983; Svoboda i Cronenwett 2014). Opisano ponadto dystrybucję współczulnych komórek nerwowych wysyłających terminale do skóry i zawierających jednocześnie D $\beta$ H i NPY (Gibbins i Morris 1990). Dane dotyczące współwystępowania w tego typu komórkach nerwowych D $\beta$ H z SOM, GAL, nNOS, SP, VIP, LENK lub PACAP nie występują w literaturze światowej poza niniejszym opracowaniem.

### **Omówienie wyników z Publikacji 3**

Przeprowadzone badania wykazały, że:

a) źródłem unerwienia pęcherza moczowego świni są głównie DRG z odcinka krzyżowego (S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> i S<sub>4</sub>; z pikiem szczytowym w S<sub>3</sub>), których udział stanowi 90,5% z całej populacji (100%).

b) populacja komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy składała się z trzech subpopulacji: komórki małe ( $<30 \mu\text{m}$ ), średnie ( $30\text{-}50 \mu\text{m}$ ) i duże ( $>50 \mu\text{m}$ ). Należy podkreślić, że ich dystrybucja była niejednorodna i uwarunkowana lokalizacją w określonym DRG części krzyżowej

c) wzory dystrybucji komórek nerwowych w poszczególnych subdomenach (obwodowo-dogłowa – p-cr, obwodowo-dooonowa – p-ca, centralna – c, obwodowo-centralna – c-c i obwodowo-odśrodkowa p-c) różniły się w zależności od średnicy opisywanych komórek. Wykazano między innymi, że komórki nerwowe o małej i średniej wielkości występowały częściej w subdomenach c i c-c. Z kolei rozmieszczenie dużych komórek w omawianych subdomenach było bardziej zróżnicowane i uwarunkowane lokalizacją w odcinku DRG

d) małe, średnie i duże komórki nerwowe zaopatrujące pęcherz moczowy wykazywały immunoreaktywność dla SP, CGRP, IB4, TRPV1, PACAP, GAL, nNOS, CB i NF200. Przykładowo, wykazano, że komórki nerwowe o małej średnicy zawierały częściej NF200, IB4, SP, CGRP i PACAP niż GAL, nNOS lub CB. Porównanie małych komórek nerwowych zawierających SP i CGRP pomiędzy poszczególnymi poziomami DRG w odcinku krzyżowym wykazało znaczne różnice w odsetku komórek nerwowych wykazujących obecność badanych substancji. Wykazano m.in., że w  $S_3$  odsetek małych komórek nerwowych zawierających SP był wyższy niż w  $S_2$ . Z kolei odsetek komórek nerwowych w tej samej klasie wielkości, ale zawierających CGRP w  $S_4$  był niższy, szczególnie w porównaniu do  $S_2$ . Interesującą obserwacją jest stwierdzenie wyższego odsetka komórek nerwowych o średniej wielkości zawierających NF200, IB4, SP, CGRP i GAL w porównaniu z komórkami o małych rozmiarach. Ponadto, częstotliwość występowania w poszczególnych DRG odcinka krzyżowego średniej wielkości komórek nerwowych immunoreaktywnych dla SP miała tendencję wzrostową, podczas gdy liczba komórek NF200-pozytywnych malała w kierunku doogonowym ( $S_2 > S_3 > S_4$ ). Duże komórki nerwowe sporadycznie wykazywały immunoreaktywność dla IB4, TRPV1, CGRP, PACAP lub nNOS.

e) badane substancje współwystępowały w tej samej komórce nerwowej. Wykazano m.in., że ogromna większość komórek nerwowych o małej średnicy zawierających SP była jednocześnie pozytywna wobec TRPV1, IB4 lub NF200. Wśród populacji komórek nerwowych o średniej wielkości jedynie 1/3 wykazywała jednoczesne współwystępowanie w tej samej komórce nerwowej SP z TRPV1 (w  $S_2$  i  $S_4$ ) lub IB4 (w  $S_2$ ). Z kolei, komórki nerwowe o dużej średnicy wykazywały koekspresję SP z TRPV1 lub IB4 głównie w  $S_2$ . Ponadto porównanie odsetka komórek nerwowych zawierających CGRP i NF200 pomiędzy poszczególnymi DRG części krzyżowej wykazało znaczne różnice. Stwierdzono m.in., że odsetek komórek nerwowych o średniej wielkości, immunoreaktywnych dla obu badanych substancji zmniejsza się w kierunku doogonowym ( $S_2 > S_3 > S_4$ ).

Pomimo, iż źródła pochodzenia czuciowych włókien nerwowych zaopatrujących różne struktury pęcherza moczowego świni zostały już dość dobrze udokumentowane (Bossowska i wsp. 2009; Russo i wsp. 2013; Pidsudko 2014) to jednak różnice i podobieństwa w dystrybucji i kodowaniu chemicznym pomiędzy populacjami komórek nerwowych zlokalizowanych w poszczególnych krzyżowych DRG nie były jak dotąd badane. W literaturze dostępna jest zaledwie jedna praca w której autor porównał u samca świni dystrybucję oraz kodowanie chemiczne neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy, zestawiając ze sobą dane uzyskane z DRG części lędźwiowej i krzyżowej (Pidsudko 2014).

W pracy tej nie badano jednak odsetka komórek nerwowych zawierających IB4 i TRPV1 (ważne markery czuciowe), ani somatotopii tych struktur.

#### **Omówienie wyników z Publikacji 4**

Przeprowadzone badania wykazały, że:

a) średnia powierzchnia przekroju komórek nerwowych zaopatrujących skórę kończyny tylnej świni ( $2158 \pm 272 \mu\text{m}^2$ ) jest znacznie większa niż komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy ( $1159 \pm 78 \mu\text{m}^2$ ). Podobną zależność wykazano porównując średnicę komórek nerwowych reprezentujących obie populacje ( $54 \pm 2 \mu\text{m}$ , skóra;  $41 \pm 1 \mu\text{m}$ , pęcherz moczowy).

b) poszczególne populacje wybarwionych komórek nerwowych różnią się wielkością komórek, które tworzą ich reprezentatywną pulę. Wykazano między innymi, że w populacji neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy (trzewno-sensoryczne) większość stanowiły komórki o małej (59,9%) lub średniej wielkości (33,9%), podczas gdy duże były obserwowane rzadko (6,2%). Z kolei, w populacji neuronów zaopatrującej skórę (somato-sensoryczne), wiodącą populację stanowiły komórki o średniej wielkości (59,8%), podczas gdy małe i duże były znacznie mniej licznie reprezentowane (odpowiednio 33,2% i 7,0).

c) kodowanie chemiczne somato- i trzewno-sensorycznych komórek nerwowych na terenie DRG różniło się istotnie pomiędzy porównywanymi populacjami. Przykładowo, odsetek neuronów o małej lub średniej wielkości, immunoreaktywnych dla SP/TRPV1, SP/CGRP, SP/GAL, CGRP/TRPV1, CGRP/IB4 i CGRP/GAL był znacznie niższy w populacji komórek zaopatrujących pęcherz moczowy niż skórę. Wykazano m.in., że komórki nerwowe o małej średnicy zaopatrujące skórę i zawierające SP/TRPV1 i SP/CGRP stanowiły odpowiednio 95% i 84%, podczas gdy populacja komórek zaopatrująca pęcherz moczowy była reprezentowana w mniejszym odsetku (SP/TRPV1 - 76%, SP/CGRP - 40%). Odsetek małych neuronów zawierających jednocześnie SP i GAL również był znacznie wyższy w populacji komórek unerwiających skórę niż pęcherz moczowy. Wszystkie neurony czuciowe zaopatrujące skórę charakteryzowały się współwystępowaniem CGRP i TRPV1, podczas gdy w populacji komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy stwierdzono ten typ kodowania chemicznego tylko w ich połowie. W odniesieniu do neuronów o średniej wielkości około 60% spośród zaopatrujących skórę było dodatnich dla SP/CGRP, podczas gdy jedynie 3% komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy zawierało oba te markery. Odsetek neuronów o średniej wielkości zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę, które były jednocześnie immunoreaktywne dla CGRP i TRPV1 był zbliżony. Wykazano między innymi, że prawie jedna czwarta komórek nerwowych w obu populacjach wykazywała jednoczesne współwystępowanie CGRP z TRPV1. W odniesieniu do dużych neuronów reprezentujących obie populacje wykazano sporadyczne współwystępowanie SP i CGRP, TRPV1 lub IB4.

Badania niniejsze stanowią pierwsze opracowanie, w którym porównano ze sobą dwie populacje neuronów: somato- i trzewno-sensorycznych u świni. Badania te wykazały, że obie populacje mają wiele cech wspólnych, ale istnieją też między nimi bardzo istotne różnice. Jak dotąd zbadano w podobny sposób jedynie dystrybucję różnych podtypów pęcherzykowego transportera glutaminianu i receptora purynowego 2X w populacjach neuronów DRG zaopatrujących pęcherz moczowy, skórę kończyny tylnej i/lub jelita (Zhong

i wsp. 2003; Malet i Brumovsky 2015). Dane porównawcze dotyczące współwystępowania w neuronach somato- i trzewno-sensorycznych SP z CGRP, GAL, IB4 lub TRPV1 oraz CGRP z GAL, IB4 lub TRPV1 są poza opracowaniem niniejszym niedostępne.

## Podsumowanie

Wyniki opisanych badań potwierdzają istnienie podobieństw i różnic w dystrybucji i kodowaniu chemicznym pomiędzy populacjami neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy (trzewno-sensorycznymi), a tymi populacjami, które zaopatrują skórę kończyny tylnej świni (somato-sensorycznymi; **Publikacja 1, 3 i 4**). Wykazano, że pierwsza z tych populacji jest przede wszystkim reprezentowana przez neurony o małej średnicy, podczas gdy druga z nich przez komórki o średniej wielkości. Choć nie prowadzono wcześniej podobnych badań porównawczych i zjawisko to nie zostało opisane wcześniej (**Publikacja 4**), prawdopodobne jest, że różnice w morfologii mogą być związane z precyzyjnie określonymi funkcjami poszczególnych subpopulacji neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę. Na przykład, jak już wspomniano wcześniej, większość aferentnych, zmielinizowanych (włókna A $\delta$ ) lub niezmielinizowanych (włókna C) włókien nerwowych w ścianie pęcherza moczowego jest wypustkami neuronów o małej średnicy, które przenoszą głównie sygnały nocycyptywne (de Groat i Yoshimura 2009). Z kolei, skórne szlaki czuciowe wymagają głównie aktywacji komórek nerwowych średniej wielkości (Boada i Woodbury 2007). Co więcej, prezentowane badania wykazały, że najwyższy odsetek neuronów trzewno-sensorycznych (małe i średnie) odnotowano głównie w subdomenach: centralnej i obwodowo-centralnej, podczas gdy w populacji neuronów somato-sensorycznych występowały one najczęściej w subdomenach: dogłowowo- i doogonowo-obwodowej (**Publikacja 1 i 3**). Tak precyzyjna lokalizacja komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę może być związana z położeniem obu narządów w ustroju (linia pośrodkowa – pęcherz) i wskazywać na ich somatotopię. Ponadto, obserwowane w prezentowanym cyklu eksperymentów różnice w kodowaniu chemicznym neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy i skórę w obrębie poszczególnych odcinków DRG lub SChG (**Publikacje 1 - 4**) mogą być związane z różnymi rodzajami informacji docierających do tych komórek nerwowych z narządów, które zaopatrują (Sugiura i wsp. 1989).

Podsumowując, wyniki niniejszych badań stanowią ważną podstawę do lepszego zrozumienia procesów fizjologicznych zachodzących w obrębie pęcherza moczowego i skóry oraz do określenia udziału w tych procesach omawianych substancji biologicznie aktywnych. Mogą być one również wykorzystane w przyszłości w celu bardziej precyzyjnego badania neurogennych mechanizmów chorób pęcherza moczowego i skóry u ludzi.

## Uwagi końcowe

Dystrybucja i kodowanie chemiczne komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy (szczególnie) i skórę kończyny tylnej opisane w tej serii eksperymentów to wstęp do bardziej szczegółowych badań mających na celu poznanie fizjologicznej funkcji wybranych substancji biologicznie czynnych. Co więcej, wyniki dotyczące populacji czuciowych komórek nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy i zaprezentowane w **Publikacji 3 i 4** stanowią niewielki wycinek projektu pt. „*Analiza in vitro i in vivo trzewno-afferentnych neuronów unerwiających pęcherz świni?*” realizowanego przeze mnie w latach 2012-2016 i finansowanego przez Narodowe

Centrum Badań. W pierwszym etapie projektu dokładnie scharakteryzowano dystrybucję oraz fenotyp czuciowych komórek nerwowych pod kątem obecności SP, CGRP, PACAP, GAL, nNOS, SOM i CB. Natomiast w etapie drugim przeprowadzono hodowle *in vitro* w których wyizolowane z DRG komórki nerwowe (wyznakowane wstecznie i niewyznakowane) zostały poddane inkubacji (12h, 24h i 48h) z wybranymi czynnikami neurotroficznymi (czynnik wzrostu nerwów, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, neutrofiny-3, czynnik troficzny pochodzenia głojowego oraz czynnik wzrostu fibroblastów) i cytokinami (czynnik hamujący białaczkę, czynnik neurotroficzny pochodzenia rzęskowego, interleukina 1, 6 i 19). Po zakończeniu hodowli komórkowych wybarwiano wszystkie komórki nerwowe na obecność wyżej wymienionych substancji oraz  $\beta$ -tubuliny III (marker struktur neuronalnych) w celu określenia zmian w kodowaniu chemicznym tych komórek pod wpływem różnych substancji oraz ich morfologii (rozmiar komórki, całkowita długość aksonu, długość najdłużej wypustki, liczba odgałęzień aksonów). Dotychczas tego typu badania były przeprowadzone w hodowlach *in vitro* z użyciem zwierząt laboratoryjnych (głównie szczurów). Jednakże, należy podkreślić, że dane uzyskane u gryzoni nie mogą być bezpośrednio wykorzystane do wyjaśnienia mechanizmów molekularnych kierujących plastycznością neuronów (wzrastaniem lub rozgałęzieniem) podczas regeneracji u ludzi. W związku z tym w prezentowanym projekcie modelem zwierzęcym była świnia, która pozwoliła na uzyskanie wyników, które mają większe przełożenie na sytuację obserwowaną u ludzi podczas procesów plastyczność i/lub regeneracji nerwów obwodowych. Prace z drugiego etapu realizacji projektu, będące obecnie w przygotowaniu, niewątpliwie poszerzą istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmów neuronalnej plastyczności/neuroregeneracji w dokładnie określonej populacji "trzewnych" komórek nerwowych. Co więcej, w kolejnym etapie wydaje się być bardzo ważne, aby wyjaśnić, czy „trzewne” neurony DRG dostarczające bodźce czuciowe z organów wewnętrznych odpowiadają na uszkodzenie lub działanie czynników troficznycy/cytokin w taki sam sposób jak "somatyczne" (np. zaopatrujące skóry tylnej kończyny świni za pośrednictwem m.in. nerwu kulszowego). Ponadto, w odniesieniu do skóry świni z kończyny tylnej planuję zbadać dystrybucję włókien nerwowych zawierających m.in. dynofinę A, noradrenalinę i acetylocholinę w kolokalizacji z wybranymi peptydami i receptorami oraz określić ich dokładną lokalizację w poszczególnych jej warstwach.

#### **Piśmiennictwo:**

1. Abraira VE, Ginty DD (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron* 79 (4):618-639
2. Aoki Y, Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, Moriya H (2005) Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents. *Spine (Phila Pa 1976)* 30; 13:1496-1500
3. Avon SL, Wood RE (2005) Porcine skin as an in-vivo model for ageing of human bite marks. *J. Forensic Odontostomatol.* 23(2):30-39
4. Barabas ME, Stucky CL (2013) TRPV1, but not TRPA1, in primary sensory neurons contributes to cutaneous incision-mediated hypersensitivity. *Mol. Pain* 9(9)
5. Boada MD, Woodbury CJ (2007) Physiological properties of mouse skin sensory neurons recorded intracellularly in vivo: temperature effects on somal membrane properties. *J. Neurophysiol.* 98(2):668-680



6. Bossowska A, Crayton R, Radziszewski P, Kmiec Z, Majewski M (2009) Distribution and neurochemical characterization of sensory dorsal root ganglia neurons supplying porcine urinary bladder. *J. Physiol. Pharmacol.* 60(4):77-81
7. Bossowska A, Lepiarczyk E, Mazur U, Janikiewicz P, Markiewicz W (2015) Botulinum toxin type A induces changes in the chemical coding of substance P-immunoreactive dorsal root ganglia sensory neurons supplying the porcine urinary bladder. *Toxins (Basel)*. 7(11):4797-4816
8. Brading AF (1999) The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp. Physiol.* 84:215-221
9. Charkoudian N (2003) Skin blood flow in adult human thermoregulation: How it works, when it does not, and why. *Mayo Clin. Proc.* 78:603-612
10. Chyczewski M, Wojtkiewicz J, Bossowska A, Jalyński M, Brzeski W, Kowalski IM, Majewski M (2006) Sources of porcine longissimus dorsi muscle (LDM) innervation as revealed by retrograde neuronal tract-tracing. *Folia Histochem. Cytobiol.* 44(3):189-194
11. Crowe R, Burnstock G (1989) A histochemical and immunohistochemical study of the autonomic innervation of the lower urinary tract of the female pig. Is the pig a good model for the human bladder and urethra? *J. Urol.* 141:414-422
12. de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N (2015) Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol.* 5(1):327-396
13. de Groat WC, Yoshimura N (2009) Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. In: *Sensory Nerves*. Springer; 91-138
14. Debeer S, Le Ludec JB, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas JF, Dubois B, Kanitakis J (2013) Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur. J. Dermatol.* 23:456-466
15. Di Giminiani P, Petersen LJ, Herskin MS (2013) Nociceptive responses to thermal and mechanical stimulations in awake pigs. *Eur. J. Pain* 17:638–648
16. Djouhri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM, Lawson S (2003) The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J. Physiol. Lond.* 550:739-752
17. Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M (1989) Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:289-306
18. Gibbins IL, Furness JB, Costa M, Macintyre I, Hillyard CJ, Girgis S (1985) Colocalization of calcitonin gene-related peptide like immunoreactivity with substance P in cutaneous vascular and visceral sensory neurons of guinea-pigs. *Neurosci. Lett.* 57:125-130
19. Gibbins IL, Morris JL (1990) Sympathetic noradrenergic neurons containing dynorphin but not neuropeptide Y innervate small cutaneous blood vessels of guinea-pigs. *J. Auton. Nerv. Syst.* 29:137-149
20. Hayashi A, Moradzadeh A, Hunter DA, Kawamura DH, Puppala VK, Tung TH, Mackinnon SE, Myckatyn TM (2007) Retrograde labeling in peripheral nerve research: it is not all black and white. *J. Reconstr. Microsurg.* 23(7):381-389
21. Herron AJ (2009) Pigs as dermatologic models of human skin disease. *Proceeding of the ACVP/ASVCP Concurrent Annual Meetings, December 5–9, 2009, Monterey, California, USA*
22. Hsieh ST, Lin WM, Chiang HY, Huang IT, Ko MH, Chang YC, Chen WP (1997) Skin innervation and its effects on the epidermis. *J. Biomed. Sci.* 4(5):264-268

23. Jänig W, Kümmel H (1981) Organization of the sympathetic innervation supplying the hairless skin of the cat's paw. *J. Auton. Nerv. Syst.* 3:215-230
24. Johnson MS (2008) The role of cutaneous innervation in the sensory abnormalities associated with diabetic neuropathy. University of Kansas (Dissertation)
25. Kim JW, Lee DW, Choi WH, Jeon YR, Kim SH, Cho H, Lee EJ, Hong ZY, Lee WJ, Cho J (2013) Development of a porcine skin injury model and characterization of the dose-dependent response to high-dose radiation. *J. Radiat. Res.* 54 (5):823-831
26. Le Pichon CE, Chesler AT (2014) The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Front. Neuroanat.* 8:21
27. Lepiarczyk E, Bossowska A, Kaleczyc J, Skowrońska A, Majewska M, Majewski M, Majewski M (2017) the influence of resiniferatoxin (RTX) and tetrodotoxin (TTX) on the distribution, relative frequency, and chemical coding of noradrenergic and cholinergic nerve fibers supplying the porcine urinary bladder wall. *Toxins (Basel)*. 9(10): pii: E310
28. Lepiarczyk E, Majewski M, Bossowska A (2015) The influence of intravesical administration of resiniferatoxin (RTX) on the chemical coding of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine urinary bladder. *Histochem Cell Biol.* 144(5):479-489
29. Levi JR, Veerappan A, Chen B, Mirkov M, Sierra R, Spiegel JH (2011) Histologic evaluation of laser lipolysis comparing continuous wave vs pulsed lasers in an in vivo pig model. *Arch. Facial Plast. Surg.* 13(1):41-50
30. Li CL, Li KC, Wu D, Chen Y, Luo H, Zhao JR, Wang SS, Sun MM, Lu YJ, Zhong YQ, Hu XY, Hou R, Zhou BB, Bao L, Xiao HS, Zhang X (2016) Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res.* 26(1):83-102
31. Lindh B, Lundberg JM, Hökfelt T (1989) NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- and substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic and sensory ganglia and their projections. *Cell Tissue Res.* 256:259-273
32. Malet M, Brumovsky PR (2015) VGLUTs and glutamate synthesis-focus on DRG neurons and pain. *Biomolecules.* 5(4):3416-3437
33. Mandge D, Manchanda R (2018) A biophysically detailed computational model of urinary bladder small DRG neuron soma. *PLoS Comput Biol.* 18; 14(7):e1006293
34. Mark AL, Abboud FM, Schmid PG, Heistad DD, Mayer HE (1972) Differences in direct effects of adrenergic stimuli on coronary, cutaneous, and muscular vessels. *J. Clin. Investig.* 51:279-287
35. McGlone F, Reilly D (2010) The cutaneous sensory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34(2):148-159
36. McLachlan EM, Jänig W (1983) The cell bodies of origin of sympathetic and sensory axons in some skin and muscle nerves of the cat hindlimb. *J. Comp. Neurol.* 214(2):115-130
37. Mills IW, Noble JG, Brading AF (2000) Radiotelemetered cystometry in pigs: validation and comparison of natural filling versus diuresis cystometry. *J. Urol.* 164:1745-1750
38. Minett MS, Eijkelkamp N, Wood JN (2014) Significant determinants of mouse pain behaviour. *PLoS One* 9(8):e104458
39. Mitchell BS, Ahmed E, Stauber VV (1993) Projections of the guinea-pig paracervical ganglion to pelvic viscera. *Histochem. J.* 25:51-56

40. Moore JA, Brading AF (2007) A porcine model of bladder outlet obstruction incorporating radiotelemetered cystometry. *BJU Int.*100:1192-1193
41. Moss HE, Tansey EM, Milner P, Lincoln J, Burnstock G (1990) Neuropeptide immunoreactivity and choline acetyltransferase activity in the mouse urinary bladder following inoculation with Semliki Forest Virus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 31:47-56
42. Naumann T, Härtig W, Frotscher M (2000) Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies *J. Neurosci. Methods* 103:11-21
43. Parsons BA, Drake MJ, Gammie A, Fry CH, Vahabi B (2012) The validation of a functional, isolated pig bladder model for physiological experimentation. *Front Pharmacol.* 3:52
44. Persson K, Alm P, Johansson K, Larsson B, Andersson KE (1995) Co-existence of nitrergic, peptidergic and acetylcholine esterase-positive nerves in the pig lower urinary tract. *J Auton Nerv Syst* 52:225-236
45. Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JG, Cooper BY (2000) Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J. Neurophysiol.* 84:2365-2379
46. Pidsudko Z (2000) Distribution and chemical coding of neurons in the porcine inferior mesenteric ganglion projecting to the urinary bladder trigone. 56. ASGBI/AG/NAV Tripartite Meeting St John's College Cambridge. Ref Type: Conference Proceeding
47. Pidsudko Z (2004) Distribution and chemical coding of neurons in intramural ganglia of the porcine urinary bladder trigone. *Folia Histochem. Cytobiol.* 42:3-11
48. Pidsudko Z (2014) Immunohistochemical characteristics and distribution of sensory dorsal root ganglia neurons supplying the urinary bladder in the male pig. *J. Mol. Neurosci.* 52(1):71-81
49. Romei C, Bonifacino T, Milanese M, Usai C, Raiteri L (2016) Colocalization of neurotransmitter transporters on the plasma membrane of the same nerve terminal may reflect cotransmission. *Brain Res. Bull.* 127:100-110
50. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnnett NW, Steinhoff M (2009) Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol. Rev.* 86(4):1309-1379
51. Roth S, Kummer W (1994) A quantitative ultrastructural investigation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive axons in the hairy skin of the guinea pig. *Anat. Embryol.* 190:155–162
52. Ruocco I, Cuello AC, Parent A, Ribeiro-da-Silva A (2002) Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers. *J. Comp. Neurol.* 448:323-336
53. Ruscheweyh R, Forsthuber L, Schoffnegger D, Sandkühler J (2007) Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Aβ-, Aδ-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *J. Comp. Neurol.* 502(2):325-336
54. Russo D, Clavenzani P, Sorteni C, Bo Minelli L, Botti M, Gazza F, Panu R, Ragionieri L, Chiochetti R (2013). Neurochemical features of boar lumbosacral dorsal root ganglion neurons and characterization of sensory neurons innervating the urinary bladder trigone. *J. Comp. Neurol.* 1; 521(2):342-366

55. Smet PJ, Edyvane KA, Jonavicius J, Marshall VR (1996) Neuropeptides and neurotransmitter synthesizing enzymes in intrinsic neurons of the human urinary bladder. *J Neurocytol* 25:112-124
56. Smith ES, Lewin GR (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *J. Comp. Physiol A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 195:1089-1106
57. Stief CG, Benard F, Bosch RJ, Aboseif SR, Lue TF, Tanagho EA (1990) A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis. *J. Urol.* 143:392-397
58. Sugiura Y, Terui N, Hosoya Y (1989) Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *J. Neurophysiol.* 62(4):834-840
59. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P (2001) The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 9:66-76
60. Suzuki H, Aoyama Y, Senzaki K, Vincler M, Wittenauer S, Yoshikawa M, Ozaki S, Oppenheim RW, Shiga T (2010) Characterization of sensory neurons in the dorsal root ganglia of Bax-deficient mice. *Brain Res.* 1362:23-31
61. Svoboda RM, Cronenwett JL (2014) Lumbar sympathectomy for lower extremity ischemic ulcers. In *Therapy in Vascular and Endovascular Surgery*, 5th ed.; Stanley, J.C., Veith, F.J., Wakefield, T.W., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 612
62. Swindle MM, Moody DC, Phillips LD (1992) Swine as a models in biomedical research. Ames: Iowa State Univ Press
63. Takahashi A, Wada Y, Ohtori S, Saisu T, Moriya H (2003) Application of shock waves to rat skin decreases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons. *Auton. Neurosci.* 107(2):81-84
64. Teufl F, Dammann F, Wehrmann M (1997) In vitro study of morphology of the bladder wall using MR tomography at 1.0 Tesla: correlation with histology. *Rofo.* 166:406-410
65. Vera PL, Nadelhaft I (1992) Afferent and sympathetic innervation of the dome and the base of the urinary bladder of the female rat. *Brain Res. Bull.* 29:651-658
66. Vetrugno R, Liguori R, Cortelli P, Montagna P (2003) Sympathetic skin response: Basic mechanisms and clinical applications. *Clin. Auton. Res.* 13:256-270
67. Wakabayashi Y, Kojima Y, Makiura Y, Tomoyoshi T, Maeda T (1995) Acetylcholinesterase-positive afferent axons in mucosa of urinary bladder of adult cats: retrograde tracing and degeneration studies. *Histol. Histopathol.* 10:523-530
68. Warburton AL, Santer RM (1994) Sympathetic and sensory innervation of the urinary tract in young adult and aged rats: a semi-quantitative histochemical and immunohistochemical study. *Histochem. J.* 26:127-133
69. Wessels WJ, Feirabend HK, Marani E (1990) Somatotopic organization in the sensory innervation of the rat hindlimb during development, using half dorsal root ganglia as subsegmental units. *Eur. J. Morphol.* 28(2-4):394-403
70. Yoshimura N, de Groat WC (1999) Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J. Neurosci.* 19:4644-4653
71. Zhong Y, Banning AS, Cockayne DA, Ford AP, Burnstock G, McMahon SB (2003) Bladder and cutaneous sensory neurons of the rat express different functional P2X receptors. *Neuroscience* 120(3):667-675

72. Zhou Y, Ling EA (1998) Colocalization of nitric oxide synthase and some neurotransmitters in the intramural ganglia of the guinea pig urinary bladder. *J. Comp. Neurol.* 394:496-505
73. Zimmerman A, Bai L, Ginty DD (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science* 346 (6212):950-954
74. Zvarova K, Murray E, Vizzard MA (2004) Changes in galanin immunoreactivity in rat lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia after spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 475:590-603

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Oprócz 4 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 4 Autoreferatu jestem współautorem **dotychczasowych 27 oryginalnych prac badawczych i 2 prac poglądowych**. Spośród 29 prac, **16 opublikowano po uzyskaniu stopnia doktora** i to właśnie te prace zostaną omówione poniżej.

Liczba	<b>16</b>
Sumaryczny IF ( <i>zgodnie z rokiem publikacji</i> )	<b>35,058</b>
Sumaryczna punktacja MNiSW ( <i>zgodnie z rokiem publikacji</i> )	<b>387</b>

Problematyka naukowa wszystkich tych publikacji dotyczy **obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego**, a znakomita ich większość koncentruje się na **plastyczności komórek nerwowych podczas różnych stanów patologicznych**. Wśród chorób szczególną uwagę poświęcono zespołowi policystycznych jajników, nowotworom przewodu pokarmowego oraz zespołowi nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD; ang. *attention-deficit hyperactivity disorder*). Tematykę badawczą tych prac podzielić można na 4 **główne kierunki**, które przedstawiono chronologicznie (od najstarszego do najnowszego).

### Kierunek 1. Unerwienie i aktywność steroidogenna niezmiennych i torbielowatozmienionych jajników.

1. Kodowanie chemiczne neuronów zwoju kręgowego tylnego (CaMG) zaopatrującego jajnik dojrzalej płciowo świni. Po podaniu do obu jajników znacznika FB zdefiniowano typy komórek nerwowych (małe i duże) oraz ich rozmieszczenie na terenie CaMG, które zaopatrywały ten narząd. Ponadto, zdefiniowano również ich chemizm za pomocą podwójnych barwień immunofluorescencyjnych wykazując obecność D $\beta$ H, NPY, SOM i GAL. Podobną analizę przeprowadzono również w odniesieniu do włókien nerwowych obecnych na terenie jajnika (**Publikacja 1**).

Wykazano, że 76,38% komórek nerwowych w CaMG zaopatrujących jajnik to komórki małe, natomiast duże stanowiły jedynie 23,62%. Stwierdzono, że komórki FB-dodatnie zaopatrujące jajnik, obok D $\beta$ H, zawierały jednocześnie NPY (43,38%), SOM (18,77%) i GAL (18,31%). Podczas gdy, noradrenergiczne komórki nerwowe FB-pozytywne były pozbawione w 53,49% NPY, w 79,06% SOM i w 77,16% GAL. Jedynie,  $1,47 \pm 0,5\%$  komórek nerwowych FB-pozytywnych nie zawierało żadnej z badanych substancji, a  $3,33 \pm 0,4\%$  miało nie-noradrenergiczny charakter, gdyż zawierały jedynie NPY, SOM lub GAL. Co więcej, oba typy komórek nerwowych zaopatrujących jajnik (małe i duże)

były unerwione przez nieliczne włókna nerwowe zawierające D $\beta$ H, NPY, SOM i/lub GAL. Uzyskane wyniki pozwoliły scharakteryzować typy i rozmieszczenie komórek nerwowych zaopatrujących jajnik zlokalizowanych na terenie CaMG. Co więcej, obecność tak licznych noradrenergicznych komórek nerwowych na terenie omawianego zwoju może sugerować ich ważną rolę w regulacji funkcjonowania gonad u tych zwierząt.

2. Unerwienie torbielowato zmienionych jajników. W cyklu prac dotyczących tego zagadnienia zdefiniowano unerwienie noradrenergiczne, cholinergiczne i czuciowe torbielowato zmienionego jajnika. Co więcej, w gonadach tych, zbadano również poziom dopaminy (DA), noradrenaliny (NA) oraz adrenaliny (A) (**Publikacje 2-6**).

Wykazano, że torbiele jajnikowe u loszek wywołane przez podawanie dexametazonu (DMX) począwszy od środkowej fazy lutealnej (7-21) charakteryzowały się znacznie większą gęstością włókien noradrenergicznych zawierających D $\beta$ H, a także NPY jako kotransmitera tych włókien, w porównaniu do loszek z grupy kontrolnej. Ponadto, w torbielowato zmienionych jajnikach stwierdzono wzrost zawartości katecholamin (DA, NA i A) zarówno w ścianie pęcherzyków i/lub torbieli, jak również w pobranym z nich płynie. Wykazano również, że poziom progesteronu (P<sub>4</sub>) i androstendione (A<sub>4</sub>) w ścianie torbieli również był podwyższony, podczas gdy poziomy A<sub>4</sub>, testosteronu (T) i estradiolu-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) w płynie pobranym z omawianych struktur był obniżony (**Publikacja 4**).

Biorąc pod uwagę fakt, że jajnik unerwiany jest, obok włókien noradrenergicznych, przez włókna cholinergiczne zbadano wzór unerwienia przez tą komponentę torbielowato zmienionych jajników świni. Jako marker acetylocholino posłużył w tym celu pęcherzykowy transporter acetylocholino (VACHT). Ponadto, w cholinergicznych włóknach nerwowych biegnących na terenie torbielowato zmienionego jajnika określono obecność innych substancji będących kotransmiterami w tych włóknach, m.in. nNOS, VIP oraz SOM. Wykonane badania pozwoliły stwierdzić obecność włókien nerwowych VACHT-, nNOS- i SOM-immunoreaktywnych (-IR) wokół ściany torbieli oraz pęcherzyków trzeciorzędowych. Z kolei, włókna nNOS-IR, a także VACHT-IR były obserwowane w pobliżu pęcherzyków jajnikowych drugorzędowych i żył; podczas gdy włókna nerwowe zawierające VACHT i nNOS nie występowały wokół tętnic na terenie kory torbielowatego jajnika. Tymczasem liczba włókien nerwowych VIP-IR wzrosła istotnie w pobliżu torbieli i na terenie spłotu śródmiąższowego kory i rdzenia jajnika, podczas gdy liczba włókien VACHT-IR zmniejszyła się istotnie na terenie omawianej struktury w części rdzeniowej gonady (**Publikacja 5**).

Ostatnią komponentą nerwową, która została zbadana na terenie torbielowatego jajnika loszek była komponenta czuciowa. W celu określenia dystrybucji włókien czuciowych w torbielowato zmienionych jajnikach posłużono się następującymi markerami: SP, CGRP i GAL. Wykazano, że zarówno wzór dystrybucji czuciowych włókien nerwowych oraz ich gęstość różniły się istotnie w porównaniu do tych obserwowanych w gonadach kontrolnych. Między innymi, wykazano na terenie torbielowatego jajnika, że włókna nerwowe zawierające SP i/lub CGRP występowały w splocie śródmiąższowym, jak również otaczały naczynia żyłne i tętnicze na terenie jego rdzenia, podczas gdy były one nieobecne w jajnikach kontrolnych. Co więcej, liczba włókien nerwowych GAL-IR na terenie spłotu śródmiąższowego torbielowatego jajnika było wyższa niż ta obserwowana w gonadach kontrolnych (**Publikacja 2**).

Poprzednie badania wykazały, że w torbielowatych jajnikach wzrostowi gęstości noradrenergicznych włókien nerwowych towarzyszy również zwiększona zawartość

hormonów steroidowych w jego wybranych strukturach. W celu lepszego zrozumienia roli wewnątrzjajnikowych włókien nerwowych w procesie tworzenia się torbieli jajnikowych oraz towarzyszących im zmian w aktywności steroidogennej jajników przeprowadzono ich odnerwienie (3 dzień pierwszego badanego cyklu) przed indukcją torbieli jajnikowych. Po denerwacji jajników (przecięcie nerwu najwyższego jajnika i splotu jajnikowego), a następnie indukcji torbieli jajnikowych (podawanie DXM w dniach 7-21 cyklu) wykazano podczas oceny makroskopowej gonad brak torbieli, średniej wielkości pęcherzyków i ciałek żółtych, podczas gdy liczba małych pęcherzyków uległa znacznemu zwiększeniu. Co więcej, w odnerwionych jajnikach i późniejszej indukcji torbieli zaobserwowano zmniejszenie liczby włókien zawierających D $\beta$ H oraz NPY, któremu towarzyszyło obniżenie zawartości P<sub>4</sub>, A<sub>4</sub>, T i E<sub>2</sub> w płynie i/lub w ścianie pęcherzyków w porównaniu do wartości otrzymanych u loszek kontrolnych. Podobny wynik wykazano również w odniesieniu do poziomu białka P450<sub>scs</sub>, 3 $\beta$ -HSD i P450<sub>arom</sub> w małych pęcherzykach jajnikowych (**Publikacja 3**).

Uzyskując bardzo interesujące wyniki z wykorzystaniem zwierzęcego modelu do badań nad etiopatogenezą torbieli postanowiono również zbadać wzór unerwienia policystycznych jajników kobiet. W tym celu skrawki takich jajników zostały poddane barwieniom immunofluorescencyjnym na obecność D $\beta$ H, VAcHT, nNOS, SP, CGRP, NPY, VIP, SOM, GAL i PACAP. Wykazano, że w policystycznych jajnikach kobiet wzrasta liczba włókien nerwowych zawierających D $\beta$ H-, VAcHT-, VIP- lub GAL-IR w zrębie jajnika, jak również D $\beta$ H-IR w pobliżu pęcherzyków pierwotnych i żył na terenie rdzenia. Z kolei, obniżeniu uległa gęstość włókien nerwowych nNOS-, CGRP-, SOM- i PACAP-IR w obrębie zrębu jajnika. Stwierdzono także pojawienie się włókien nerwowych zawierających SP, CGRP i/lub GAL w pobliżu naczyń krwionośnych zarówno na terenie rdzenia, jak i kory torbielowatego jajnika. Co więcej, wykazano brak włókien nerwowych nNOS-IR zlokalizowanych w pobliżu pęcherzyków pierwotnych oraz włókien nerwowych VIP-IR występujących wokół tętnic i tętniczek na terenie rdzenia tych gonad (**Publikacja 6**).

Podsumowując, uzyskane powyżej wyniki sugerują, że zmiany w strukturze unerwienia torbielowatych jajników mogą pociągać za sobą zmiany w aktywności steroidogennej tych struktur i odgrywać ważną rolę w patogenezie i/lub przebiegu tego schorzenia, które warunkowane są w przypadku świni fazą cyklu rujowego w której rozpoczęto indukowanie torbieli.

## **Kierunek 2. Neurochemiczna organizacja enterycznego układu nerwowego w pobliżu nacieku nowotworowego, ze szczególnym uwzględnieniem czynników apoptotycznych, nekrotycznych i neuroprotektynnych.**

W cyklu prezentowanych prac przeanalizowano potencjalne przyczyny zaniku splolotozwojów mięśniówkowych (MP) i/lub podśluzówkowych (SP) na terenie ściany jelit i żołądka znajdujących się w pobliżu nacieku nowotworu. W tym celu w tkankach wyznakowano kaspazę 3 (CASP3) i 8 (CASP8), mieloperoksydazę (marker neutrofilii) i CD68 (marker makrofagów) oraz GAL i transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę (CART) (**Publikacje 10, 13-14, 16**).

Wykazano, że MP zlokalizowane w ścianie jelita grubego w sąsiedztwie nacieku nowotworu uległy atrofii (zmniejszona średnica oraz liczba komórek nerwowych tworzących te splolotozwoje). Z kolei, odsetek komórek nerwowych zawierających CASP3 i 8, zlokalizowanych w MP i SP był zbliżony zarówno w ścianie jelita grubego znajdującej się blisko, jak i dystalnie od inwazji nowotworu. Natomiast, porównując frekwencję komórek

nerwowych w MP znajdujących się w ścianie jelita zlokalizowanej w pobliżu nowotworu wykazano, że odsetek komórek zawierających CASP8 był istotnie wyższy niż komórek CASP3. Z kolei, odsetek komórek nerwowych tworzących MP zawierających jednocześnie CASP8 i GAL i zlokalizowanych w ścianie jelita w pobliżu i w oddaleniu od nowotworu był trzykrotnie niższy niż komórek nerwowych zawierających CASP3 i GAL. Natomiast odsetek komórek nerwowych zlokalizowanych w SP i zawierających GAL był istotnie wyższy w ścianie jelita znajdującej się dystalnie od nowotworu niż w bezpośrednim jego sąsiedztwie. Analiza liczby neutrofilii i makrofagów wykazała istotny wzrost neutrofilii na terenie i wokół MP w sąsiedztwie inwazji nowotworu, podczas gdy liczba makrofagów była porównywalna w obu badanych próbach (w pobliżu nacieku nowotworowego i dystalnie od niego) **(Publikacja 10)**.

Proces nowotworowy może powodować wyraźne zmiany w ENS ludzkiego żołądka. Wykazano, że średnica MP zlokalizowanych w pobliżu inwazji raka ulega wyraźnemu zmniejszeniu, podczas gdy liczba komórek tworzących te splotozwoje pozostaje niezmienną. Co więcej, odsetek neuronów zawierających CASP3 w obrębie MP zlokalizowanych w ścianie żołądka dotkniętej rakiem był wyższy, podczas gdy zawierających CASP8 był niższy, w porównaniu do części ściany żołądka niezmienną makroskopowo. Dodatkowo podwyższonej immunoekspresji CASP3 lub CASP8 w neuronach z MP towarzyszyła zmniejszona immunoekspresja GAL **(Publikacja 14)**.

Analiza przeprowadzona w kolejnym badaniu, miała na celu scharakteryzowanie wzoru dystrybucji CART (peptyd neuroprotektynny) w jelitowym układzie nerwowym człowieka podczas procesu nowotworzenia. Podwójne barwienia immunofluorescencyjne pozwoliły oszacować odsetek komórek nerwowych tworzących splotozwoje w tkance makroskopowo niezmienną, który wynosił odpowiednio: w MP  $30,1 \pm 4,1\%$ , w zewnętrznym SP (OSP)  $12,9 \pm 5,2\%$  oraz w wewnętrznym SP (ISP)  $4,1 \pm 1,3\%$ . Z kolei, odsetek komórek nerwowych zawierających ten peptyd w splotozwojach zlokalizowanych w pobliżu inwazji nowotworu wynosiła odpowiednio: w MP  $36,1 \pm 6,7\%$ , w OSP  $32,7 \pm 7,3\%$  i w ISP  $12,1 \pm 3,8\%$ . Ponadto, analiza gęstości włókien nerwowych zawierających CART w poszczególnych warstwach ściany jelita wykazała obecność istotnych różnic pomiędzy tkanką z pogranicza guza, a tą znajdującą się dystalnie od niego **(Publikacja 13)**.

W odniesieniu do żołądka objętego procesem nowotworzenia wykazano, że odsetek neuronów zawierających PGP 9.5 z CART i/lub GAL był zbliżony w obu badanych regionach w pobliżu inwazji nowotworu i w regionie dystalnie od niego. Co więcej, w nowotworowo zmienionej ścianie żołądka obserwowano zmiany w gęstości włókien nerwowych. Na przykład zaobserwowano zmniejszenie liczby włókien nerwowych CART-dodatnich (+) w mięśniówce podłużnej (LML) i okrężnej (CML) w porównaniu z niezmiennym obszarem. Znaczące zmiany w gęstości włókien nerwowych CART+/GAL+ (wzrost) zaobserwowano w LML i w warstwie mięśniowej błony śluzowej (LMM) w obszarach żołądka dotkniętych nowotworem. Ponadto, zwiększonej liczbie tych włókien towarzyszył wzrost liczby włókien zawierających GAL w sąsiedztwie guza **(Publikacja 16)**.

Podsumowując, uzyskane powyżej wyniki sugerują, że proces nowotworzenia pociąga za sobą zmiany w morfologii splotozwojów oraz chemizmie komórek nerwowych, które je tworzą. Co więcej, otrzymane wyniki podkreślają plastyczność obwodowego układu nerwowego (komórki nerwowe i włókna nerwowe na terenie ENS) wywołaną progresją procesu nowotworowego.



### **Kierunek 3. Czynniki zewnętrzne i wewnętrzne wpływające na zdolność regeneracji i adaptacji komórek nerwowych pochodzących ze zwojów korzeni dogrzebietowych (DRG).**

W prezentowanych pracach przeanalizowano udział kinazy tyrozynowej w procesie regeneracji aksonów komórek nerwowych DRG jak również włókien mielinowych tworzących nerw kulszowy u myszy oraz lipopolisacharydu (LPS) na chemizm tych komórek u świni (**Publikacje 7 i 15**).

Wykazano u dorosłych myszy pozbawionych białka sygnałowego Sprouty 2 ( $Spry2^{-/-}$ ), będącego inhibitorem sprzężenia zwrotnego sygnalizacji receptorowej kinazy tyrozynowej, silniejszą regulację aktywności kinazy pozakomórkowej i zwiększony wzrost aksonów. Wyraźny wzrost aksonów zaobserwowano w hodowlach neuronów pochodzących od heterozygotycznych osobników ( $Spry2^{+/-}$ ), podczas gdy neurony pochodzące od homozygot charakteryzowały się wyraźnym rozgałęzieniami. W uszkodzonym nerwie kulszowym wykazano szybszą jego regenerację u myszy  $Spry2^{+/-}$  niż  $Spry2^{-/-}$ . Myszy  $Spry2^{+/-}$  charakteryzowały się większą liczbą włókien mielinowych w regenerującym się nerwie kulszowym, płytek motorycznych w mięśniach kończyny tylnej i zwiększonym poziomem mRNA GAP-43 (białko zaangażowane w neuroplastyczność). Z kolei, myszy  $Spry2^{-/-}$  charakteryzowały się wyższymi funkcjami mechanosensorycznymi (test von Freya), którym towarzyszyło zwiększone unerwienie naskórka, zwiększenie liczby niemielinizowanych aksonów i neuronów IB4-pozytywnych zlokalizowanych w DRG (**Publikacja 7**).

W pierwszej części doświadczenia mającej na celu scharakteryzowanie lokalizacji i chemizmu neuronów zaopatrujących zastawkę krętniczko-kątową (ICV) stwierdzono, że jest ona unerwana przez zakończenia nerwowe, których ciała komórki zlokalizowane są w DRG ( $Th_7-L_4$ ). Z kolei, analiza neurochemiczna tych komórek wykazała, że w 50% wykazują one obecność SP lub CGRP, a w 40% GAL. Druga część doświadczenia dotyczyła wpływu niskiej dawki lipopolisacharydu (LPS) z *Salmonelli* serotypu: *Enteritidis* (LPS-E), *Minnesota* (LPS-M) i *Typhimurium* (LPS-T) na przeżywalność i chemizm neuronów DRG. Wykazano, że LPS nie zmieniał liczby neuronów DRG w hodowlach *in vitro*, ale wpływał na ich fenotyp. Przykładowo, wykazano wzrost odsetka komórek nerwowych SP-pozytywnych po wcześniejszej ich inkubacji z LPS-E, podczas gdy dodatek do medium LPS-M i LPS-T wywierał przeciwny efekt. Z kolei, odsetek komórek nerwowych GAL-pozytywnych uległ znacznemu obniżeniu po inkubacji komórek nerwowych w obecności LPS-E i LPS-M, podczas gdy odsetek komórek nerwowych CGRP-pozytywnych pozostawał na niezmiennym poziomie zarówno po dodaniu do medium LPS-E, jak i LPS-M oraz LPS-T (**Publikacja 15**).

Prezentowane wyniki badań obrazują plastyczność neuronów DRG pod wpływem zarówno czynników endogennych, jak i egzogennych.

### **Kierunek 4. Patofizjologia zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD).**

W pierwszej z prac wykazano, że neurony zawierające parwalbuminę lub kalretyninę w podstawno-bocznej części ciała migdałowatego wyposażone są w receptory GABAA z podjednostką  $\alpha 1$ , receptory nikotynowe acetylocholino z podjednostką  $\alpha 7$  (ACh $\alpha 7$ ) i/lub receptory dopaminy typu 2 ( $D_2$ ). Powszechnie wiadomo, że ta część ciała migdałowatego odpowiada za reakcje emocjonalne, które są nieadekwatne u dzieci z ADHD. Uzyskane wyniki prezentują, zatem potencjalny mechanizm hamowania neuronów projekcyjnych w tej części ciała migdałowatego u szczurów Wistar Kyoto Rats (WKY; kontrola szczurów SHR -

Spontaneously hypertensive rat – model ADHD) poprzez ACh $\alpha$ 7 lub odhamowanie tych komórek poprzez D<sub>2</sub> (**Publikacja 11**).

W kolejnej pracy zbadano zachowanie się szczurów SHR i WKY w zmiennych warunkach środowiska. Wykazano, że szczury SHR spędzały więcej czasu na czworokątnym placu i częściej przekraczały linię wewnętrzną i zewnętrzną niż szczury WKY, co świadczy o redukcji zachowań lękowych u tych zwierząt. Stwierdzono także, że funkcje motoryczne były ujemnie skorelowane z zachowaniami lękowymi u szczurów SHR, ale nie u szczurów WKY (**Publikacja 12**).

Podsumowując poznanie mechanizmów ADHD, wymaga w pierwszej kolejności szczegółowego poznania funkcjonowania wybranych obszarów mózgu w warunkach fizjologicznych. Następnym krokiem jest poznanie czynników zewnętrznych, które mogą modyfikować zachowanie pacjentów i zwierząt modelowych. W ostatnim etapie należy zgłębić interakcje pomiędzy układem nerwowym, endokrynnym i immunologicznym w celu lepszego poznania patofizjologii ADHD.

### Varia

W prezentowanych pracach przeanalizowano wpływ witamin i mineralów na szlak przemian kynureniny oraz określenie zawartości niacyny w codziennej diecie sportowców (**Publikacja 8 i 9**).

Prezentowana praca przeglądowa opisuje wpływ witamin i mineralów na szlak przemian kynureniny w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Metabolizm tryptofanu szlakiem kinureninowym (KP) prowadzi do powstania wielu neuroaktywnych metabolitów, które mogą odgrywać ważną rolę w patofizjologii zespołu jelita drażliwego, choroby Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona, schizofrenii, zespołu otępiennego występującego w przebiegu AIDS, depresji, epilepsji i procesu starzenia. Wykazano, że modulacja KP poprzez hamowanie lub pobudzanie syntezy i/lub aktywności enzymów może stanowić nowy wariant tradycyjnej terapii. Istnieją dowody na to, że zmiany stężenia wielu witamin i mineralów, które odgrywają kluczową rolę jako koenzymy i kofaktory w syntezie *de novo* dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego mogą wpływać na KP. Przykładowo, zmniejszenie dostępności aktywnej formy witaminy B<sub>6</sub> wpływa na hydroksylazę tryptofanu, aminotransferazę kinureninową i kinureninazę (KYNU). Z kolei, niedobór witaminy B<sub>2</sub> powodują zmniejszenie aktywności enzymu 3-monoooksygenazy kinureninowej zależnego od dinukleotydu flawinoadeninowego. Wykazano również udział mineralów w prawidłowym funkcjonowaniu enzymów zaangażowanych w metabolizm L-tryptofanu. Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup> wpływają na aktywność KYNU, a Mg<sup>2+</sup> reguluje fosforybozylotransferazę chinolinianową. Tymczasem Fe<sup>2+</sup> odpowiada za prawidłowe działanie zarówno 2,3-dioksygenazy indoloaminowej, jak i dioksygenazy kwasu 3-hydroksantranilowego. Zmiany w stężeniu metabolitów KP i aktywności enzymatycznej stwierdzono w wielu stanach patologicznych. Dlatego też tak ważne wydaje się regulowanie stężenia wybranych kinurenin lub enzymów w KP, które mogą mieć znaczenie terapeutyczne i lecznicze w odniesieniu do różnych schorzeń (**Publikacja 8**).

Stwierdzono, że w grupie przebadanych sportowców codzienne posiłki dostarczały średnio 28,5 mg niacyny u kobiet i 22,4 mg u mężczyzn. Organizacja do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa oraz Światowa Organizacja Zdrowia zalecają codzienne spożycie niacyny u osób w wieku powyżej 19 lat na poziomie 15,2 mg (2300 kcal<sup>-1</sup>) dla kobiet i 21,1 mg (3200 kcal<sup>-1</sup>) dla mężczyzn. Jednak w przypadku sportów wytrzymałościowych popyt na niacynę może

wzrosnąć odpowiednio do 23,8 mg i 30,4 mg. Wykazano, że tylko 15% wszystkich diet uwzględniło zwiększone zapotrzebowanie na niacynę (27% w grupie kobiet i 0% mężczyzn). W pozostałych przypadkach osoby te powinny suplementować jej niedobory zwłaszcza, gdy jej popyt wzrasta znacznie wraz ze wzrostem spożycia kalorii. Co więcej, analiza dziennego spożycia żywności przez sportowców wykazała, że nie pokrywa się ono w pełni z Zalecanym Dziennym Spożyciem dotyczącym niacyny z powodu wysokiego dziennego spożycie węglowodanów i niskiego spożycie kalorii. Dlatego też codzienna dieta sportowców powinna być bardziej zbilansowana w celu zaspokojenia wszystkich potrzeb organizmu **(Publikacja 9)**.

### Piśmiennictwo

1. Koszykowska M, **Kozłowska A**, Wojtkiewicz J, Skobowiat C, Majewski M, Jana B. *Distribution and chemical coding of sympathetic neurons in the caudal mesenteric ganglion projecting to the ovary in sexually mature gilts*. Acta Vet. Hung. 2010, 58(3): 389-403.
2. **Kozłowska A**, Wojtkiewicz J, Majewski M, Jana B. *Localization of substance P, calcitonin gene related peptide and galanin in the nerve fibers of porcine cystic ovaries*. Folia Histochem. Cytobiol. 2011, 49(4):622-630.
3. Jana B, **Kozłowska A**, Wojtkiewicz J, Majewski M. *Effect of porcine ovaries denervation on dexamethasone-induced cyst formation*. Acta Vet. Hung. 2013, 61(2): 220-233.
4. **Kozłowska A**, Wojtkiewicz J, Majewski M, Jana B. *The noradrenergic innervation and steroidogenic activity of porcine cystic ovaries*. Physiol. Res. 2013, 62(4): 421-433
5. **Kozłowska A**, Majewski M, Jana B. *Changes in the cholinergic innervation pattern of porcine ovaries with cysts induced by dexamethasone administration*. J. Mol. Neurosci. 2014, 54(1):10-19.
6. Wojtkiewicz J, Jana B, **Kozłowska A**, Crayton R, Majewski M, Zalecki M, Baranowski W, Radziszewski P. *Innervation pattern of polycystic ovaries in the women*. J. Chem. Neuroanat. 2014, 61-62:147-52.
7. Marvaldi L, Thongrong S, **Kozłowska A**, Irschick R, Pritz CO, Bäumer B, Ronchi G, Geuna S, Hausott B, Klimaschewski L. *Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice*. Dev. Neurobiol. 2015, 75/3: 217-231.
8. Majewski M, **Kozłowska A**, Thoene M, Lepiarczyk E, Grzegorzewski WJ. *Overview of the role of vitamins and minerals on the kynurenine pathway in health and disease*. J. Physiol. Pharmacol. 2016, 67(1): 3-19.
9. Majewski M, **Kozłowska A**, Thoene M, Lebedzińska A. *Variations of niacin content with regard to carbohydrates in energy-rich diets of elite European athletes and their relation with dietary RDA*. J. Elem. 2016, 21(3): 745-755.
10. **Kozłowska A**, Kwiatkowski P, Oponowicz A, Majewski M, Kmieć Z, Godlewski J. *Myenteric plexuses atrophy in the vicinity of colorectal cancer tissue is not caused by apoptosis or necrosis*. Folia Histochem. Cytobiol. 2016, 54(2): 99-107.
11. Równiak M, Kolenkiewicz M, **Kozłowska A**. *Parvalbumin, but not calretinin, neurons express high levels of alpha1-containing GABAA receptors, alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors and D2-dopamine receptors in the basolateral amygdala of the rat*. J. Chem. Neuroanat. 2017, 86: 41-51.
12. Tsai ML, **Kozłowska A**, Li YS, Shen WL, Huang ACW. *Social factors affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housing-style factor*. Psychiatry Res. 2017, 254: 290-300.

13. Oponowicz A, **Kozłowska A**, Gonkowski S, Godlewski J, Majewski M. *Changes in the distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-containing neural structures in the human colon affected by the neoplastic process*. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19: 1-11.
14. **Kozłowska A**, Kozera P, Majewski M, Godlewski J. *Co-expression of caspase-3 or caspase-8 with galanin in the human stomach section affected by carcinoma*. Apoptosis 2018, 23(9-10): 484-491.
15. Mikołajczyk A, **Kozłowska A**, Gonkowski S. *Distribution and neurochemistry of the porcine ileocaecal valve projecting sensory neurons in the dorsal root ganglia and the influence of lipopolysaccharide from different serotypes of salmonella spp. on the chemical coding of DRG neurons in the cell cultures*. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(9).
16. **Kozłowska A**, Godlewski J, Majewski M. *Distribution patterns of cocaine- and amphetamine-regulated transcript- and/or galanin-containing neurons and nerve fibers located in the human stomach wall affected by tumor*. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(11), 3357; DOI: 10.3390/ijms19113357.

### **Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi**

#### **Kierownik projektu międzynarodowego**

1. *Patofizjologiczna charakterystyka struktury komórek i aktywności wybranych struktur mózgowia w nadpobudliwości psychoruchowej z zaburzeniami uwagi na modelu szczurzym*. 2015-2018. Projekt realizowany w ramach współpracy polsko-tajwańskiej finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (PL-TW II/4/2015). Konkurs II.

#### **Kierownik projektu krajowego**

1. *Analiza in vitro i in vivo trzewno-aferyentnych neuronów unerwiających pęcherz świni*. 2012-2016. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (2011/03/B/NZ4/06451). Opus 2.

### **Współpraca z innymi instytucjami naukowymi udokumentowana w postaci publikacji**

#### Uniwersytet Medyczny w Innsbrucku, Austria

1. Marvaldi L, Thongrong S, **Kozłowska A**, Irschick R, Pritz CO, Bäumer B, Ronchi G, Geuna S, Hausott B, Klimaschewski L. (2015) *Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice*. Developmental Neurobiology 75/3: 217-231, DOI: 10.1002/dneu.22224

#### National Ilan University oraz Yilan Fo Guang University, Yilan County, Taiwan

1. Tsai ML, **Kozłowska A**, Li YS, Shen WL, Huang ACW. (2017) *Social factors affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housing-style factor*. Psychiatry Research 254:290-300, DOI: 10.1016/j.psychres.2017.05.008
2. **Kozłowska A**, Wojtacha P, Równiak M, Kolenkiewicz M, Tsai ML (2018) *Differences in serum steroid hormones concentrations in spontaneously hypertensive rats (SHR) - an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)*. Physiological Research 2018 Oct 23. [Epub ahead of print]
3. **Kozłowska A**, Wojtacha P, Równiak M, Kolenkiewicz M, Chih Wei Huang A. *Examinations of ADHD pathogenesis in neurological, endocrine and immune systems for the juvenile and maturing SHR vs WKY rats*. Psychopharmacology (w trakcie korekty po pierwszych recenzjach)

### ***Działalność recenzencka***

Zrecenzowałam 14 publikacji dla następujących czasopism o zasięgu międzynarodowym:

1. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013, 1 publikacja
2. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2013, 1 publikacja
3. *Endocrine*, 2014, 2 publikacje
4. *International Journal of Women's Health*, 2014, 1 publikacja
5. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015, 1 publikacja
6. *Brain and Behavior*, 2015, 1 publikacja
7. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015-2016, 2 publikacje
8. *Comparative Effectiveness Research*, 2017, 1 publikacja
9. *Neuropeptides*, 2018, 1 publikacja
10. *Journal of Applied Life Science*, 2018, 1 publikacja
11. *Journal of International Medical Research*, 2018, 1 publikacja
12. *Journal of Modern Human Pathology*, 2018, 1 publikacja

Byłam również recenzentem **3 prac licencjackich** studentów studiów stacjonarnych Wydziału Nauk o Zdrowiu (wcześniej Wydziału Nauk Medycznych; kierunek Dietetyka i Pielęgniarstwo).

### ***Członkostwo w organizacjach oraz towarzystwach naukowych***

Członkostwo w Polskim Towarzystwie Histochemików i Cytochemików (PTHC) od 2014 - nadal

### ***Krajowe i zagraniczne staże, kursy, szkolenia***

#### **Staż w zagranicznych ośrodkach naukowych lub akademickich:**

1. University of Western Ontario, Department of Biology, Ontario, Kanada - Prof. Greg Kelly (06-27 sierpień 2012). Staż dydaktyczny w ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie" w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (1/POKL/4.1.1/2010).
2. Uniwersytet Medyczny w Innsbrucku, Austria (4-17 listopad 2012). Staż dydaktyczny.
3. Uniwersytet Medyczny w Innsbrucku, Austria (15 lipiec-12 sierpień 2013). Staż naukowy w ramach wymiany osobowej do protokołu wykonawczego z Republiką Austrii (program wspomaga mobilność naukowców).
4. National Taiwan University, Tajpej, Tajwan (23 sierpień-13 wrzesień 2017). Staż naukowy w ramach realizacji projektu pt. „*Patofizjologiczna charakterystyka struktury komórek i aktywności wybranych struktur mózgowia w nadpobudliwości psychoruchowej z zaburzeniami uwagi na modelu szczurzym*”.

#### **Staż w krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich:**

1. Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie (16 listopad – 06 grudzień 2014), Katedra i Zakład Fizjologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim. Stażu dydaktyczny ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie, Program Operacyjny Kapitał Ludzki”.

**Kursy:**

1. Kurs języka angielskiego dla średniozaawansowanych organizowany przez Szkołę Języków Obcych English Perfect (6 miesięcy: 13 luty - 06 czerwiec 2012).
2. Kurs „Doskonalenia pedagogicznego nauczycieli akademickich” UWM w Olsztynie czerwiec 2012 (54 h dydaktyczne).
3. Udział w kursie zagranicznym w ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie", Program Operacyjny Kapitał Ludzki w School of Health Professions Education na Uniwersytecie w Maastricht, Holandia. Summer Course: "Expanding Horizons in Problem-based Learning" (16-28 czerwiec 2013).
4. Kurs dydaktyczny w celu pogłębienia wiedzy z zakresu technik edukacyjnych, jak również nabycie nowych umiejętności związanych z nauczaniem problemowym w ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie. Program Operacyjny Kapitał Ludzki". Uniwersytecie w Antwerpii, Belgia (20 – 26 październik 2014).
5. Kurs dydaktyczny w celu pogłębienia wiedzy z zakresu technik edukacyjnych, jak również nabycie nowych umiejętności związanych z nauczaniem problemowym w ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie. Program Operacyjny Kapitał Ludzki". Uniwersytet Medyczny w Innsbrucku, Austria (28 styczeń - 1 luty 2015).

**Szkolenia:**

1. Szkolenie „Broker Innowacji” realizowane przez Dom Doradztwa Biznesowego „MM” Monika Majcher z siedzibą w Kielcach, Olsztyn (1 marzec 2009 – 28 luty 2010).
2. Udział w szkoleniu "Finansowanie prac badawczych z zakresu Nauk o Życiu w ramach konkursów ogłaszanych przez NCN" organizowanym przez Ministerstwo Zdrowia oraz NCN, Warszawa (7 marzec 2014).
3. Szkolenie: Jak interpretować prawa autorskie na uczelni? "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie" Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (24 i 27 czerwiec 2014).
4. Szkolenie: Z zakresu praw autorskich i tekstów naukowych "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie" Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (23 i 26 czerwiec 2014).
5. Warsztaty szkoleniowe dotyczące metody „CLARITY” w Laboratorium Deisseroth Stanford School of Medicine Facility, Stanford University, Palo Alto, California, USA (28-30 lipiec, 2014).
6. Szkolenie z technik prezentacji. "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie" Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (24 września 2014).
7. Szkolenie z zakresu "Problem Based Learning" w ramach projektu „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie. Program Operacyjny Kapitał Ludzki” przeprowadzony przez nauczycieli akademickich z School of Health Professions Education z Uniwersytetu w Maastricht, Holandia (3-5 listopada 2014).

8. Szkolenie łączone dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta oraz doszkalanie dla opiekunów. UWM w Olsztynie (12 - 16 październik 2015).
9. Działania Marie Skłodowska-Curie w programie Horyzont 2020-konkursy na finansowanie międzynarodowej wymiany pracowników (RISE) i kształcenia młodych naukowców (ITN). Szkolenie organizowane przez Regionalny Punkt Kontaktowy UWM w Olsztynie (25 luty 2016).
10. Szkoleniu dla osób aktualnie realizujących projekty badawcze krajowe finansowane z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju realizowane przez UWM w Olsztynie (3 marzec 2016).
11. Jak skutecznie promować własne wyniki badań podczas wystąpień publicznych i poprzez media społecznościowe. Szkolenie organizowane przez Regionalny Punkt Kontaktowy UWM w Olsztynie (9-10 maj 2016).
12. Warsztaty mikroskopii konfokalnej. Pracownia Mikroskopii Konfokalnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa (31 maj 2016).
13. Indywidualne stypendia (Individual Fellowship) Marie Skłodowska-Curie w programie Horyzont 2020 – wskazówki jak przygotować wnioski. Szkolenie organizowane przez Regionalny Punkt Kontaktowy UWM w Olsztynie (9 czerwiec 2016 i 20 czerwiec 2017).
14. Doskonalenie kompetencji diagnostyczno-interwencyjnych w sytuacji kryzysowej. Autodestrukcja – samookaleczenia, zachowania samobójcze. Suicydolog Ryszard Jabłoński, Olsztyn (3 grudnia 2017).
15. Jak prawidłowo wspierać studenta z niepełnosprawnością, Szkolenie przeprowadzone przez firmę „TECHPAL” na zlecenie UWM w Olsztynie (23 marzec 2018).
16. Terapia Skoncentrowana na Rozwiązania – kurs podstawowy zorganizowany przez „Centrum Rozwiązań”, Jacek Szczepkowski (6 kwiecień – 13 maja 2018).

### ***Działalność dydaktyczna***

W ramach działalności dydaktycznej prowadzę ćwiczenia głównie z przedmiotu Fizjologia dla studentów kierunku Raatownictwo Medyczne oraz Anatomia i fizjologia narządów mowy dla studentów kierunku Logopedia. Jestem koordynatorem zajęć z przedmiotu Fizjologia, na kierunku Ratownictwo Medyczne. W latach 2013-2018 byłam promotorem jedenastu prac licencjackich studentów studiów stacjonarnych Wydziału Nauk o Zdrowiu (wcześniej Wydziału Nauk Medycznych; kierunek Dietetyka) Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Od 2012 roku sprawuję opiekę naukową nad studentami kierunku lekarskiego i dietetyki, którzy aktywnie uczestniczą w badaniach prowadzonych w ramach działalności Koła Naukowego Fizjologów Doświadczalnych w Katedrze Fizjologii Człowieka.

### ***Nagrody i wyróżnienia***

2016 - Nagroda Indywidualna Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie II stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej.

**Inne osiągnięcia**

1. Członek Rady Programowej kierunku Ratownictwo Medyczne, 2015 - nadal.
2. Opiekun roku na kierunku Dietetyka na Wydziale Nauk o Zdrowiu (wcześniej Wydziale Nauk Medycznych), UWM w Olsztynie, 2015-2018.
3. Członek Wydziałowego Zespołu Doradczego ds. Dobrostanu Zwierząt na Wydziale Lekarskim, UWM w Olsztynie, 2016-2018.
4. Nawiązanie współpracy międzynarodowej Polsko-Tajwańskiej, której efektem jest podpisanie porozumienia pomiędzy Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, a National Ilan University w Ilanie, Tajwan umożliwiającego bilateralną wymianę studentów, 2016.

**6. INFORMACJE BIBLIOMETRYCZNE:****Analiza bibliometryczna dorobku naukowego**

(szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego znajduje się w załączniku nr 5)

<b>DOROBEK</b>	<b>Liczba</b>	<b>IF rok wydania</b>	<b>MNiSW rok wydania</b>
Publikacje habilitacyjne	4	10,616	100
Pozostałe publikacje po uzyskaniu stopnia doktora	16	35,058	387
Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	13	5,334	139
<b>RAZEM</b>	<b>33</b>	<b>51,008</b>	<b>626</b>

<b>ŹRÓDŁO</b>	<b>INDEKS HIRSCHA</b>
Web of Science™ All Databases	7
Scopus	7

<b>ŹRÓDŁO</b>	<b>INDEKS CYTOWAŃ</b>
Web of Science™ All Databases	143
Scopus	122

Szczegółowy wykaz pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych znajduje się w załączniku nr 2: Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

Olsztyn, 07.12.2018 r.

dr Anna Kozłowska

*Anne Kozłowska*