

AUTOREFERAT

Dr Anna Zacharko-Siembida

Zakład Anatomii Zwierząt

Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2017

1. Imię i Nazwisko

Anna Zacharko-Siembida

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

Tytuł zawodowy: lekarz weterynarii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie, rok uzyskania 1995

Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie, rok uzyskania 2004, tytuł rozprawy: "Ustalenie autonomicznych oraz trzewno-czuciowych ośrodków nerwowych dla gruczołu krokowego psa", promotor: dr hab. Zbigniew Boratyński

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

1996 - 2004 – asystent naukowo-dydaktyczny w Instytucie Anatomii Zwierząt (późniejszej Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt), Akademii Rolniczej w Lublinie

2004 – do dnia dzisiejszego – adiunkt w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Osiągnięcie pod tytułem:

„Ekspresja w obwodowym układzie nerwowym świni transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART) oraz jego kolokalizacja z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi”.

tworzy jednotematyczny cykl pięciu publikacji naukowych z listy A bazy JCR:

b1. Zacharko-Siembida A, Kulik P, Szalak R, Lalak R, Arciszewski MB. Co-expression patterns of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) with neuropeptides in dorsal root ganglia of the pig. Acta Histochemica 2014; 116: 390-398.

Lista A czasopism z bazy JCR; Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 15; IF₂₀₁₄ = 1,714

mój udział: 85%

moja rola: mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań i artykułu, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu preparatów kriostatowych, współwykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie uzyskanych wyników badań, przygotowaniu dokumentacji fotograficznej oraz redakcji całości tekstu artykułu.

b2. Zacharko-Siembida A, Arciszewski MB. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript-like immunoreactivity (CART-LI) in intramural ganglia of porcine urinary bladder trigone. Medycyna Weterynaryjna 2014; 70: 594-598.

Lista A czasopism z bazy JCR; Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 15; IF₂₀₁₄ = 0,218

mój udział: 90%

moja rola: mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań i artykułu, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu preparatów kriostatowych, współwykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie uzyskanych wyników badań, przygotowaniu dokumentacji fotograficznej oraz redakcji całości tekstu artykułu.

b3. Zacharko-Siembida A, Arciszewski MB. Immunoreactivity to cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the enteric nervous system of the pig and wild boar stomach. Anatomia Histologia Embryologia 2014; 43: 48-55.

Lista A czasopism z bazy JCR; Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 20; IF₂₀₁₄ = 0,672

mój udział: 90%

moja rola: mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań i artykułu, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu preparatów kriostatowych, współwykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie uzyskanych wyników badań, przygotowaniu dokumentacji fotograficznej oraz redakcji całości tekstu artykułu.

b4. Zacharko-Siembida A, Matysek M, Szalak R, Radlińska A, Obszańska K, Arciszewski MB. Distribution and immunohistochemical characteristics of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-positive nerve elements in the pelvic ganglia of the female pig. Polish Journal of Veterinary Sciences 2017; 20: 173-184.

Lista A czasopism z bazy JCR; Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 20; IF₂₀₁₆ = 0,697, brak danych za rok 2017

mój udział: 80%

moja rola: mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań i artykułu, współpobieraniu materiału badawczego, wykonaniu preparatów kriostatowych, współwykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie uzyskanych wyników badań, przygotowaniu dokumentacji fotograficznej oraz redakcji całości tekstu artykułu.

b5. Zacharko-Siembida A, Matysek M, Szalak R, Arciszewski MB. An immunohistochemical study of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expression in the pterygopalatine ganglion of the pig. Acta Veterinaria - Beograd 2017; 67: 397-408.

Lista A czasopism z bazy JCR; Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 15; IF₂₀₁₆ = 0,000; brak danych za rok 2017

Mój udział: 85%

moja rola: mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań i artykułu, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu preparatów kriostatowych, współwykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie uzyskanych wyników badań, przygotowaniu dokumentacji fotograficznej oraz redakcji całości tekstu artykułu.

c) Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Zarówno centralny jak i obwodowy układ nerwowy (z ang. *central and peripheral nervous system*; CNS, PNS) swoją nadrzędną czynność regulatorową sprawują poprzez szereg związków aktywnych, które to wpływają na swoiste receptory. Do substancji tych zalicza się klasyczne neurotransmitery takie jak noradrenalina, acetylocholina, serotonina czy histamina, jak także związki o charakterze peptydowym pełniące funkcje zarówno kotransmiterów jak i neuromodulatorów. Wiedza o tym, jakie kombinacje związków regulatorowych współwystępują w pojedynczym ciele neuronu bądź włóknach nerwowych (tzw. kodowanie chemiczne neuronów) stanowi podstawę badań neuroanatomicznych. Dzięki określeniu zestawu substancji biologicznie aktywnych możliwe jest precyzyjne określenie funkcji neuronu oraz określenie jego potencjału w reakcji na stany patologiczne (np. zapalenie, aksonotomia, choroby metaboliczne czy inne). Do rodziny neuropeptydów zalicza się dziś ponad 100 różnego rodzaju znanych związków, choć ich potencjalną liczbę określa się na ponad 1000 (Russo, 2017). Część z nich, np. substancja P (z ang. *substance P*; SP) czy wazoaktywny polipeptyd jelitowy (z ang. *vasoactive intestinal polypeptide*, VIP), została odkryta i pierwotnie zbadana już na początku ubiegłego wieku, podczas gdy niektóre stosunkowo niedawno. Do grupy tych ostatnich związków, zalicza się odkryty w 1981 roku transkrypt regulowany amfetaminą i kokainą (z ang. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*; CART).

Historia odkrycia CART wiąże się z badaniami Spiess i wsp. (1981), którzy po raz pierwszy wyizolowali tę substancję z podwzgórza owcy. Dalsze badania pozwoliły na identyfikację w mózgu szczura mRNA odpowiedzialnego za kodowanie tej molekuly sygnałowej. Wtedy też okazało się, że gen CART koduje polipeptyd (pro-CART) o długości 129 bądź 116 aminokwasów. Z kolei nazwę CART badacze wywiedli od zjawiska gwałtownej nadekspresji CART mRNA w prążkowiu, obserwowanego po dootrzewnowym podaniu dużych dawek kokainy i amfetaminy (Douglass i wsp., 1995). Dziś wiadomo, że CART występuje w dwóch biologicznie czynnych formach. Zarówno forma krótka (CART₅₅₋₁₀₂) jak i forma długa (CART₆₂₋₁₀₂) powstają na skutek posttranslacyjnego przetwarzania obydwu form pro-CART (Thim i wsp. 1999).

Badania neuroanatomiczne dowiodły, że obydwie izoformy CART są szeroko obecne w CNS ssaków (Subhedar i wsp. 2014). Ich obecność stwierdza się w ważnych ośrodkach nerwowych mózgowia, m.in. w tych powiązanych z pobieraniem pokarmu (jądro brzuszno-przyśrodkowe, jądro grzbietowo-przyśrodkowe, część boczna podwzgórza, jądro łukowate, jądro półleżące), ale także w jądrach rdzenia przedłużonego (Burman i wsp. 2004) czy rdzenia kręgowego (Dun i wsp. 2000). Dalsze badania funkcjonalne dowiodły, że rzeczywiście na poziomie centralnym CART przede wszystkim zaangażowany jest w regulację apetytu, homeostazy energetycznej i utrzymanie ciężaru ciała (Lau oraz Herzog, 2014). Dodatkowo CART w CNS uczestniczy w kontroli stresu oraz przetwarzaniu sygnałów bólowych, a także uczestniczy w patomechanizmach leżących u podstaw niektórych zaburzeń neurologicznych takich jak chociażby udar niedokrwienny, demencja czy drgawki (Zhang i wsp., 2012).

Jednak jak się wkrótce okazało, u niektórych ssaków CART występuje nie tylko w CNS, ale także, (choć w różnorodnym zakresie) w zwojach PNS. Z punktu widzenia morfologicznego PNS jest ciekawym obiektem badań chociażby, dlatego iż w odróżnieniu do CNS wykazuje pewien zakres dymorfizmu płciowego. Doskonałym przykładem takiego dymorfizmu może być obecność zwojów przynarządowych narządów układu rozrodczego, a także struktura splotu miednicznego (z ang. *plevic plexus*; PP). U ssaków PP będący specyficznym skrzyżowaniem włókien nerwowych współczulnych i przywspółczulnych daje zaopatrzenie nerwowe do narządów jamy miednicznej. Dlatego też neurony zwojów nerwowych licznie porzucanych na terenie PP wykazują zgoła odmienny charakter (notuje się obecność neuronów cholinergicznym jak i noradrenergicznym). U samic dużych ssaków PP przyjmuje kształt trójkąta, leżącego po obu stronach prostnicy i sięgającego wierzchołkiem do macicy (Woźniak oraz Skowrońska, 1967), podczas gdy u samców PP sięga aż po krawędź nasieniowodów i gruczołów pęcherzykowych (Tsaknakis, 1971). Dodatkowo u samców notuje się obecność wyraźnie zaznaczonego pojedynczego zwoju przedniego miednicznego (z ang. *anterior pelvic ganglion*) (Kaleczyc oraz wsp., 2003), podczas gdy u samic występuje słabo widoczny zwój przyszyjkowy (z ang. *paracervical ganglion*) (Łakomy oraz Szatkowska, 1992).

Na przestrzeni ostatnich lat, przy użyciu różnych narzędzi i technik badawczych ekspresję CART stwierdzono w takich zwojach obwodowych jak: zwoje enteryczne szczura (Ekblad oraz wsp., 2003), świnki morskiej (Ellis oraz Mawe, 2003), świni (Gonkowski oraz wsp.,

2009a), krowy (Janiuk oraz wsp. 2003) czy owcy (Arciszewski oraz wsp., 2009); zwoje śródtrzustkowe szczura (Wierup oraz wsp. 2007), krowy (Janiuk oraz Młynek, 2015) czy owcy (Arciszewski oraz wsp., 2008); zwoje śródsercowe szczura (Richardson oraz wsp., 2006); zwój trójdzielny szczura (Ivanusic oraz wsp., 2012); zwoje nerwu błędnego szczura (Zheng oraz wsp., 2002); zwoje rdzeniowe myszy (z ang. *dorsal root ganglia*; DRG) (Gautron oraz wsp., 2012); zwój uszny oraz skrzydłowo-podniebienny szczura (z ang. *pterygopalatine ganglion*; PPG) (Ivanusic oraz wsp., 2012) czy zwoje trójkąta pęcherza moczowego (z ang. *urinary bladder trigone*; UBT) szczura (Zvarova oraz Vizzard, 2005). Liczne eksperymenty o charakterze czynnościowym wykazały, że rola CART w PNS nie zawsze jest analogiczna jak ta stwierdzona w CNS. Co więcej, w części przypadków nie udało się jednoznacznie stwierdzić i zidentyfikować precyzyjnie roli tego neuropeptydu w obwodowej funkcjonalnej regulacji narządów wewnętrznych. Na bazie powszechnie przyjętych hipotez, sugeruje się obwodową rolę CART w histogenezie (działanie troficzne) (Risold oraz wsp., 2006), przewodzeniu bodźców nocycyptywnych (Kozsurek oraz wsp., 2007) czy neuroprotekcji (Ekblad oraz wsp., 2003). W takim ujęciu rysuje się wyraźnie widoczna luka w badaniach tego związku, w wypełnieniu której pomocne mogą być badania kodu chemicznego neuronów i włókien nerwowych CART-pozytywnych obecnych w zwojach obwodowych. Dodatkowo większość z badań funkcjonalnych nad CART przeprowadzona jest głównie na zwierzętach laboratoryjnych, podczas gdy doniesienia pochodzące od dużych ssaków są stosunkowo nieliczne. Ponadto biorąc pod uwagę różnice międzygatunkowe w strukturze PNS wyciąganie analogii w odniesieniu do człowieka w oparciu o gryzonie laboratoryjne może być utrudnione. Istnieje więc potrzeba badań kolokalizacyjnych uwzględniających różne kombinacje CART i związków biologicznie aktywnych, które mogłyby być przeprowadzone na zbliżonym do człowieka modelu doświadczalnym. Od wielu lat użycie świni w badaniach biomedycznych jest uzasadniane faktem, że ten gatunek zwierzęcia przejawia wobec człowieka spore podobieństwa anatomiczne, fizjologiczne jak i biochemiczne (Vodicka oraz wsp., 2005).

Cel badań

Dlatego też głównym celem przedłożonego do oceny cyklu publikacji naukowych było immunohistochemiczne zbadanie występowania CART w neuronach i włóknach nerwowych wybranych elementów układu nerwowego obwodowego świni (zwojach obwodowych) oraz

ustalenie, przy użyciu podwójnych lub potrójnych barwień immunohistochemicznych, które z powszechnie znanych substancji biologicznie aktywnych współwystępują (bądź też nie) z CART w badanych strukturach nerwowych.

W związku z powyższym szczegółowe cele badawcze w poszczególnych pracach obejmowały:

b1.1. Zlokalizowanie i scharakteryzowanie pod względem wielkości subpopulacje neuronów wykazujących ekspresję CART w obustronnych DRG odcinka L₁-L₆ świni.

b1.2. Ustalenie przy użyciu potrójnych barwień immunohistochemicznych, czy i w jakim zakresie w neuronach CART-immunoreaktywnych (IR) odcinka DRG L₁-L₆ współwystępują (bądź nie) SP, peptyd kodowany genem kalcytoniny (z ang. *calcitonin gene related peptide*; CGRP), kalbindyna, galanina oraz leu-enkefalina (LENK)

b2.1. Określenie czy i w jakim stopniu CART występuje w neuronach zwojów śródściennych UBT świni

b2.2. Określenie wielkości subpopulacji neuronów zwojów UBT wykazujących jednoczesną obecność CART oraz SP, kalbindyny, peptydu aktywującego cyklazę adenylową przysadki (z ang. *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*; PACAP) lub somatostatyny

b3.1. Immunohistochemiczne określenie obecności oraz oszacowanie wielkości populacji neuronów CART-IR obecnych w poszczególnych częściach żołądka (wpust, trzon oraz odźwiernik) świni

b3.2. Określenie czy i w jakim zakresie w enterycznych CART-IR neuronach oraz CART-IR włóknach nerwowych żołądka świni obecne są galanina, SP lub neuropeptyd Y (z ang. *neuropeptide Y*; NPY)

b4.1. Wykazanie obecności ekspresji CART w zwojowych neuronach i włóknach nerwowych obustronnych PP samicy świni

b4.2. Zbadanie, czy w CART-IR strukturach nerwowych PP samicy świni obecne są również neurotransmitery takie jak: acetylotransferaza cholinyl (z ang. *choline acetyltransferase*, ChAT), hydroksylaza tyrozyny (z ang. *tyrosine hydroxylase*; TH) lub serotonina

b4.3. Zbadanie, czy w CART-IR strukturach nerwowych PP samicy świni obecne są również neuropeptydy takie jak: PACAP, SP lub kalbindyna

b5.1. Wykazanie obecności i określenie wielkości subpopulacji neuronów CART-IR w obustronnych PPG świni

b5.2. Określenie przy użyciu podwójnych barwień immunohistochemicznych, czy w PPG świni CART współwystępuje (i w jakim zakresie) z SP, VIP, galaniną lub somatostatyną

Materiał i metody

Badania w eksperymentach b1), b3) i b5) zostały przeprowadzone na grupie prosiąt (n=5) w wieku około 6 tygodni (4 samice i 1 samiec) ważących do 25 kg. W eksperymentach b2) oraz b4) grupę badawczą stanowiło pięć samic prosiąt (n=5) w analogicznym wieku i o analogicznej wadze. Na przeprowadzenie wszelkich procedur eksperymentalnych uzyskano stosowne pozwolenia II Lokalnej Komisji ds. Eksperymentów na Zwierzętach w Lublinie. Zwierzęta uspakajano za pomocą azaperonu (Stresnil[®], Janssen-Cilag GmbH, Niemcy; 0,5 mg/kg m.c.), a następnie zabijano poprzez przedawkowanie pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Polska; 50 mg/kg m.c.). Następnie przystępowano do pobierania od świń dalszego materiału badawczego. Do eksperymentu b1) pobrano obustronne DRG odcinka L₁-L₆. Dobór takiego odcinka był podyktowany dwoma powodami. Po pierwsze jest to najkrótszy kompletny odcinek DRG, po drugie z badań retrotracingowych wiadomo, że z tego segmentu wywodzą się włókna nerwowe aferentne zaopatrujące przewód pokarmowy (o którym z kolei wiadomo, że jest obficie zaopatrzony we włókna i neurony CART-IR). W eksperymencie b2) za pomocą ostrych nożyczek pobierano kompletne wycinki UBT. Z kolei w doświadczeniu b3) pobierano wycinki wpustu, trzonu oraz odźwiernika żołądka świń. Taki dobór materiału badawczego został podyktowany faktem, iż w uprzednich badań Wierup i wsp. (2007) badali ekspresję CART jedynie w części dennej żołądka świni. Ponieważ żołądek świni jest żołądkiem jednokomorowym złożonym istniało spore prawdopodobieństwo, że pozostałe części żołądka mogą wykazywać pod względem ekspresji CART różnice neuroanatomiczne. W doświadczeniu b4) pobierano obustronne PP zawierające zwoje miedniczne, zaś do badań w pracy b5) pobrano obustronne PPG. Po pobraniu materiał badawczy został wypłukany w roztworze 0,9% NaCl i utrwalony przez 24-48h w

temperaturze pokojowej (RT) w mieszaninie zawierającej 15% kwas pikrynowy oraz 2% paraformaldehyd (roztwór Stefaniniego). W dalszej kolejności materiał wysycono sacharozą, po czym za pomocą kriostatu mrożeniowego wykonywano skrawki mrożeniowe o grubości 10 μm . Skrawki umieszczano na silinizowanych szkiełkach i przetrzymywano w zamrażarce do czasu dalszych barwień immunohistochemicznych.

W celu lokalizacji CART w neuronach obwodowego układu nerwowego jak i do badań kolokalizacyjnych zastosowano procedurę podwójnych/potrójnych barwień immunohistochemicznych. Do barwień wykorzystano komercyjnie dostępne przeciwciała mono i poliklonalne skierowane przeciwko neurotransmiterom oraz neuropeptydom. Szczegółowy opis procedury oraz charakterystyka użytych przeciwciał zostały zawarte w poszczególnych publikacjach. Do identyfikacji CART-ergicznych neuronów obwodowych wykorzystano dodatkowo przeciwciała skierowane przeciwko proteinie Hu C/D, która jest uznanym markerem panneuronalnym. Do wizualizacji kompleksów antygen-przeciwciało zastosowano właściwe gatunkowo przeciwciała wtórne skoniugowane z następującymi fluorochromami: FITC, Texas Red oraz AMCA. Kontroli specyficzności przeciwciał dokonano poprzez barwienia z nadmiarem syntetycznego antygenu lub poprzez zastosowanie procedury zastępowania przeciwciał nieimmunoreaktywnymi surowicami. Wybarwione immunohistochemicznie preparaty analizowano przy użyciu biologicznego semi-konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego we właściwe filtry do detekcji poszczególnych fluorochromów. W badaniach zastosowano następującą procedurę liczenia neuronów. Proporcje neuronów CART-pozytywnych zostały przedstawione jako stosowne odsetki w odniesieniu do całkowitej populacji neuronów Hu C/D-IR. Każdorazowo analizowano nie mniej niż 100 neuronów Hu C/D-IR. Oś długa neuronów Hu C/D-IR została zmierzona i na tej bazie neurony arbitralnie podzielono na małe, średnie oraz duże. W badaniach kolokalizacyjnych badaną populację stanowiło od 50 do 100 neuronów CART-IR. Odsetki neuronów wykazujących (lub nie) koekspresję CART i badanych związków wyrażono procentowo w odniesieniu do populacji neuronów CART-IR. W celu określenia liczebności włókien CART-IR zastosowano następującą skalę półilościową: brak, pojedyncze, umiarkowanie liczne, liczne i bardzo liczne. Dane ilościowe przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. W celu porównania homologicznych i niehomologicznych CART-IR subpopulacji neuronalnych zastosowano test ANOVA wraz z testem *post-hoc* Bonferroniego. Prawdopodobieństwo $P < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

Wyniki oraz ich omówienie

Zastosowana technika badawcza pozwoliła na wykazanie, że w badanych elementach PNS świni obecne są różnej wielkości subpopulacje neuronów oraz włókien nerwowych CART-IR. Charakterystyka biochemiczna pod względem kolokalizacji CART z wybranymi substancjami biologicznie aktywnymi pozwoliła na wysunięcie sugestii co do prawdopodobnej roli tego związku w regulacji czynności neuronów PNS. Głównym celem badawczym publikacji b1) była identyfikacja czuciowych neuronów CART-IR w zwojach rdzeniowych świni. Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły na wykazanie, że w obustronnych DRG odcinka L₁-L₆ świni obecne są zarówno Hu C/D-IR/CART-IR neurony jak i CART-IR włókna nerwowe. W lewych DRG najwyższy odsetek neuronów Hu C/D-IR/CART-IR odnotowano w L₁ ($5,9 \pm 1,9\%$) podczas gdy najniższy w L₅ ($3,9 \pm 0,8\%$). Z kolei w prawych DRG, odsetek neuronów Hu C/D-IR/CART-IR wahał się pomiędzy $4,4 \pm 1,7\%$ (w L₄) a $6,5 \pm 2,2\%$ (w L₂). Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w średnich wielkościach populacji neuronów Hu C/D-IR/CART-IR pomiędzy unilateralnymi jak i kontralateralnymi DRG. Zasadniczo większość ze zidentyfikowanych neuronów CART-pozytywnych lokalizowała się w centrum zwoju. W badanych DRG, większość z Hu C/D-IR/CART-IR neuronów (70-80%) należała do kategorii komórek średniej wielkości, około 15-25% zakwalifikowano jako neurony małe, zaś pozostałe 5% stanowiły neurony duże. W zarówno prawych jak i lewych DRG, średnio od $9,4 \pm 1,7\%$ (prawe L₂) do $13,5 \pm 2,9\%$ (prawe L₆) neuronów CART-IR (głównie średniej wielkości) wykazywało jednoczesną obecność SP i kalbindyny. Wszystkie zbadane CART-IR/SP-IR neurony wykazywały ekspresję kalbindyny. Z kolei około 10% subpopulacja neuronów CART-IR (przeważnie małych) wykazywała ekspresję kalbindyny, ale nie SP. Dodatkowo, obecne w DRG CART-IR włókna nerwowe nie zawierały ani SP ani kalbindyny. W CART-IR/SP-IR neuronach prawych i lewych DRG stwierdzono także obecność CGRP (od $10,5 \pm 1,4\%$ w lewym L₁ do $14,8 \pm 3,1\%$ w lewym L₅). Dodatkowo statystycznie większą subpopulację od poprzedniej stanowiły neurony CART-IR, które zawierały CGRP, ale nie wykazywały ekspresji SP (subpopulacja ta wahała się od $56,2 \pm 6,0\%$ w lewym L₆ do $64,1 \pm 6,8\%$ w prawym L₁). Stwierdzone włókna nerwowe CART-IR nie wykazywały ekspresji ani CGRP ani SP. We wszystkich z badanych DRG, stwierdzono obecność stosunkowo niewielkiej subpopulacji średniej wielkości neuronów CART-IR, które dodatkowo

wykazywały ekspresję SP oraz LENK (od $4,0 \pm 1,7\%$ w prawym L₃ do $6,0 \pm 1,3\%$ w prawym L₄). Dodatkowo w badaniach wykazano obecność wielkościowo statystycznie podobnej subpopulacji neuronalnej wykazującej ekspresję CART oraz LENK, ale nie SP (od $4,1 \pm 2,8\%$ w lewym L₁ do $6,4 \pm 2,1\%$ w lewym L₅). Zasadniczo włókna CART-IR obecne w badanych DRG nie zawierały ani SP ani LENK. Wszystkie ze zidentyfikowanych neuronów CART-IR jak i włókien nerwowych CART-IR nie zawierały galaniny. Uzyskane wyniki badań pozwalają na stwierdzenie, że dominująca większość z CART-IR neuronów należy do kategorii neuronów średnich (które są uznawane za nocyceptory włókien A δ), zaś około jedna czwarta spełnia anatomiczne kryteria dla nocyceptorów włókien C (Djoughri oraz Lawson, 2004). Wielkość stwierdzonych subpopulacji neuronów CART-IR w DRG świni nie odbiega od tej uprzednio stwierdzonej u szczura (Kozsurek oraz wsp., 2007) czy myszy (Gautron oraz wsp., 2012). Biorąc pod uwagę obecność LENK, CGRP i SP w neuronach CART-IR wydaje się, że ten związek może uczestniczyć w przetwarzaniu bodźców bólowych. Dotychczas wykazano, że funkcjonalne interakcje pomiędzy opiatami wywodzącymi się z pro-dynorfina a ich receptorami leżą u podstaw mechanizmu transmisji bólu przewlekłego (Stein, 2013). Co więcej, SP i CGRP są uznawane za mediatory uczestniczące chociażby w przebiegu zapaleń neurogennych (Birklein oraz Schmelz, 2008). Na rolę CART w DRG świni mogą dodatkowo wskazywać analogie płynące z badań tego związku w CNS ssaków. Wykazano bowiem, że na poziomie centralnym CART uczestniczy w przetwarzaniu bólu neuropatycznego oraz pośredniczy w anty-hyperalgezyjnym efekcie selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny (Upadhyaya oraz wsp., 2011). Z kolei w rdzeniu kręgowym, CART wzmacnia NMDA-zależną transmisję bodźców bólowych zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* (Chiu oraz wsp., 2006). W mysich modelach zapalenia oraz bólu neuropatycznego, CART powodował osłabienie hyperalgezji oraz allodynii i te efekty nie były znoszone przez antagonistów opioidowych (Damaj oraz wsp., 2006). Biorąc pod uwagę stwierdzoną kolokalizację CART z kalbindyną w około 20% neuronów DRG świni możliwe jest, że w regulacji czynności części z neuronów CART-IR biorą udział szlaki sygnałowe związane z jonami wapnia. Pewnym potwierdzeniem takich zależności mogą być uprzednie badania farmakologiczne, w których wykazano, że mRNA CART w komórkach GH3 podlegał częściowej regulacji (w sposób zależny od dawki i czasu) przez komórki sygnałowe zależne od jonów wapnia/kalmoduliny/CREB (Jones oraz wsp., 2009). Wyniki moich badań stanowią anatomiczną podstawę dla roli CART w regulacji neuronów czuciowych świni i dodatkowo

wykazują, że gatunek ten z powodzeniem może być wykorzystywany do badań nad CART-zależnym mechanizmem przetwarzania bólu.

W kolejnej pracy cyklu (b2) prowadzone przeze mnie badania pozwoliły na stwierdzenie obecności CART zarówno w neuronach śródściennych zwojów UBT samicy świni jak i we włóknach nerwowych obecnych w zwojach UBT. W zwojach UBT, immunoreaktywność na CART widoczna była w umiarkowanie licznych do licznych włóknach nerwowych, które zazwyczaj ciasno otaczały neurony tworząc charakterystyczne „koszyczkowate” struktury. W zwojach UBT, zaledwie $2,7 \pm 0,8\%$ spośród neuronów Hu C/D-IR wykazywało dodatkowo immunoreaktywność na CART. Zasadniczo wszystkie stwierdzone neurony Hu C/D-IR/CART-IR kwalifikowały się do kategorii komórek owalnych o średniej wielkości. Dodatkowo komórki te były zasadniczo umiejscowione w obwodowych częściach zwojów. Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały, że w zarówno CART-IR neuronach jak i CART-IR włóknach nerwowych nie występuje jednocześnie ani SP ani somatostatyna. Zaledwie pojedyncze CART-IR włókna biegnęły w bliskim sąsiedztwie neuronów SP-pozytywnych jak i zwojowych włókien SP-IR. Obecność CART-IR włókien nerwowych w sąsiedztwie somatostatyno-IR struktur była obserwowana wyłącznie okazjonalnie. Dominująca większość spośród CART-IR neuronów UBT wykazywała ekspresję PACAP, chociaż PACAP-IR neurony niewykazujące zawartości CART były bardzo liczne. Ponieważ ekspresja PACAP była widoczna jedynie w cytoplazmie neuronów stwierdzenie czy CART-IR włókna nerwowe zawierają jednocześnie PACAP było niemożliwe. Jednakże CART-IR włókna nerwowe często otaczały PACAP-IR neurony zwojowe. Ani w CART-IR neuronach UBT ani w CART-IR włóknach nerwowych nie wykazano obecności kalbindyny. Kalbindyno-IR struktury (prawdopodobnie o pochodzeniu nieneuronalnym) często leżały w bliskim sąsiedztwie CART-IR neuronów UBT. Opublikowane wyniki badań dokumentują po raz pierwszy obecność CART w zwojach UBT świni, co wskazuje na funkcjonalne znaczenie tego neuropeptydu (przynajmniej do jakiegoś stopnia) w regulacji czynności pęcherza moczowego. Dotychczas ustalono, że w pęcherzu moczowym szczura stopień ekspresji CART był związany z wiekiem zwierząt, wobec czego postulowano rolę tego związku w ontogenezie (Zvarova oraz Vizzard, 2005). Z anatomicznego punktu widzenia, zwoje UBT są częścią przywspółczulnego szlaku eferentnego wiodącego impulsy ze zwojów miednicznych (Uvelius oraz Gabella, 1998). W tym świetle schemat ekspresji CART w zwojach UBT bardzo przypomina te obserwowane w innych zwojach przywspółczulnych (Ivanusic oraz wsp.,

2012). Pochodzenie CART-IR włókien nerwowych obecnych w UBT może być dwojakie. Po pierwsze włókna te mogą się wywodzić ze zwojów PP, które zawierają pozazwojowe neurony zaopatrujące pęcherz moczowy (Keast, 2006). Druga możliwość jest taka, że CART-IR włókna nerwowe są kolateralami CART-IR pierwszorzędowych neuronów aferentnych obecnych w DRG (Kozsurek oraz wsp., 2007), także odcinka lędźwiowego świni co wykazałam w pracy (b1). Jednakże należy pamiętać że w DRG większość z neuronów CART-IR zawierała dodatkowo SP, natomiast w obecnych badaniach wszystkie CART-IR włókna nerwowe w UBT nie zawierały SP. W tej chwili rola CART w funkcjonowaniu pęcherza moczowego jest czysto hipotetyczna. Może on pełnić rolę głównego neurotransmitera bądź neuromodulatora, a także brać udział w neuroprotekcji. Ta ostatnia czynność może być związana z faktem, że u szczurów z indukowanym nadciśnieniem nerkopochodnym ilość struktur CART-IR obecnych w pęcherzu moczowym gwałtownie rośnie (Janiuk oraz Kasacka, 2013). Z kolei stwierdzona przeze mnie powszechna kolokalizacja CART z PACAP w neuronach UBT dodatkowo potwierdza hipotezę o roli CART w neurotransmisji czy procesach adaptacyjnych. Wiadomo bowiem, że PACAP odpowiada za pobudzanie neuronów UBT (Yoshiyama oraz Groat, 2008), a także zarówno obwodowo jak i centralnie wzmacnia przeżywalność neuronów jak i wypustkowanie neurytów (Tamas oraz wsp., 2012). Z drugiej jednak strony należy mieć na względzie, że w CNS fragment PACAP₆₋₃₈ został zidentyfikowany jako antagonist funkcjonalny CART (Burgos oraz wsp., 2013). Brak obecności SP, kalbindyny oraz somatostatyny w CART-IR neuronach/włóknach zwojów UBT wskazuje na pomniejszą rolę tych substancji w CART-zależnej regulacji funkcji pęcherza moczowego.

Rozpoczętą problematykę ekspresji CART w PNS, kontynuowałam w kolejnej pracy cyklu (b3), tym razem w odniesieniu do obwodowych zwojów układu nerwowego jelitowego żołądka świni. Przy zastosowaniu markera panneuronalnego Hu C/D i techniki podwójnych barwień immunohistochemicznych wykazałam, że w poszczególnych anatomicznych częściach żołądka świni ilość neuronów CART-IR jest zróżnicowana. Mianowicie o ile odsetek neuronów warstwy mięśniowej Hu C/D-IR/CART-IR we wpuscie i odźwierniku żołądka był statystycznie podobny i wynosił kolejno $42,3 \pm 3,5\%$ oraz $33,2 \pm 3,0\%$ to już wielkość analogicznej subpopulacji w trzonie żołądka była statystycznie niższa od pozostałych i wyniosła $18,0 \pm 1,9\%$. We wszystkich częściach żołądka stwierdzono obecność umiarkowanie licznych do licznych CART-IR włókien nerwowych biegnących pomiędzy

neuronami warstwy mięśniowej. We wpuszcie, odźwierniku i trzonie żołądka świni żaden z pojedynczych i rozproszonych neuronów warstwy podśluzowej nie wykazywał ekspresji CART, chociaż pojedyncze CART-IR włókna nerwowe otaczały CART-negatywne neurony podśluzowe. Warstwa mięśniowa wpustu jak i odźwiernika (zarówno mięśnie okrężne jak i podłużne) była licznie/bardzo licznie zaopatrzona w pęczki CART-IR włókien nerwowych. Z kolei ilość CART-IR włókien nerwowych obecnych w trzonie żołądka oszacowano na umiarkowanie liczną. Badania kolokalizacyjne wykazały, że we wpuszcie i odźwierniku odsetek neuronów warstwy mięśniowej CART-IR zawierających dodatkowo galaninę wynosi kolejno $35,9 \pm 2,5\%$ oraz $39,3 \pm 2,2\%$. Z kolei statystycznie mniej liczna populacja neuronów warstwy mięśniowej CART-IR/galanino-IR ($28,7 \pm 1,7\%$) była obecna w trzonie żołądka świni. Nie zaobserwowano żadnych wizualnych różnic pomiędzy schematami rozmieszczenia włókien nerwowych CART-IR/galanino-IR we wszystkich badanych częściach żołądka. Włókna te zasadniczo były licznie obecne w warstwie mięśni okrężnych (ale już nie w warstwie mięśni podłużnych), a także umiarkowanie licznie w blaszce mięśniowej warstwy śluzowej. Dodatkowo pojedyncze włókna nerwowe CART-IR/galanino-IR były również obecne pomiędzy neuronami warstwy mięśniowej jak i podśluzowej. Neurony podśluzowe zawierające galaninę były często otaczane przez CART-IR zakończenia nerwowe. We wszystkich badanych częściach żołądka neurony warstwy mięśniowej zawierające jednocześnie CART i SP były niezmiernie rzadkie (mniej niż 1%). Pojedyncze włókna nerwowe CART-IR/SP-IR obecne były w warstwie mięśniowej (okrężna i podłużna) jak i blaszce mięśniowej błony śluzowej wpustu, trzonu i odźwiernika. Zasadniczo, SP-pozytywne neurony podśluzowe były często otoczone przez CART-IR zakończenia nerwowe. Z kolei we wpuszcie, trzonie czy odźwierniku nie wykazano kolokalizacji pomiędzy CART a NPY. Wyniki badań wykazują że schemat CART-ergicznego unerwienia żołądka świni zasadniczo przypomina schematy opisywane uprzednio u innych zwierząt domowych (Ekblad, 2006; Wierup i wsp., 2007; Arciszewski i wsp., 2009). Jednak w uprzednich badaniach stwierdzano obecność CART-IR włókien nerwowych wokół naczyń krwionośnych warstwy podśluzowej żołądka szczura jak i błonie śluzowej dna żołądka świni. W odróżnieniu, w bieżących badaniach nie udało się wykazać obecności CART ani we włóknach nerwowych zaopatrujących warstwę podśluzową jak i warstwę śluzową. Znaczenie obecności mniejszego odsetka neuronów warstwy mięśniowej CART-IR w trzonie żołądka (w porównaniu do wpustu i odźwiernika) pozostaje niewyjaśnione, jednak możliwe jest, że aktywność CART

może być zmienna w zależności od rejonu żołądka. Obecność licznych zakończeń nerwowych CART-IR obecnych w warstwie mięśniowej sugeruje, że wywodzą się one z CART-IR neuronów warstwy mięśniowej i uczestniczą w regulacji motoryki, sekrecji i opróżniania żołądka. Należy mieć jednak na względzie że eksperymentalne badania nie wykazały obwodowego wpływu CART na akcję skurczową przewodu pokarmowego ponieważ CART nie wywoływał odpowiedzi motorycznej w izolowanych pasmach mięśni podłużnych żołądka i jelita cienkiego szczura (Ekblad i wsp., 2003). Co ciekawe nadekspresję CART obserwowano w klinicznych przypadkach wrzodziejącego zapalenia jelit u ludzi (Gonkowski i wsp., 2009b) jak i przy wzdęciach żołądka szczura (Kasacka oraz Piotrowska, 2012). Podobnie też odsetek CART-IR neuronów warstwy mięśniowej istotnie wzrastał podczas atrofii (ale już nie hipertrofii) jelita cienkiego wobec czego zasugerowano rolę tego neuropeptydu jako czynnika neuroprotektoryjnego (Ekblad oraz wsp., 2003). W uprzednich badaniach wykazano, że CART-IR struktury nerwowe żołądka ssaków wykazywały również ekspresję VIP, CGRP, syntetazy tlenku azotu (Ekblad, 2006; Wierup i wsp., 2007) jak również częściowo SP i NPY (Arciszewski i wsp., 2009). Co ciekawe za pomocą badań retrotracingowych udało się wykazać, że u szczurów włókna nerwowe CART-IR/SP-IR pochodzą ze zwojów nerwu błędnego (Zheng i wsp., 2002). Oczywiście możliwe też jest, że część ze stwierdzonych w żołądku świni włókien nerwowych CART-IR/SP-IR wywodzi się z DRG, szczególnie że populację takich neuronów wykazałam w pracy (b1). Współwystępowanie CART z galaniną czy SP (ale już nie NPY) rodzi pytanie o możliwość funkcjonalnej kooperacji tych związków. Wiadomo, że pośród wielu znanych działań zarówno galanina czy SP wykazują również silne działanie skurczowe i rozkurczowe w odniesieniu do mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego (Holzer-Petsche oraz wsp., 1987; Gu oraz wsp., 1994). Wyniki tych badań wzmacniają hipotezę, że w żołądku świni CART pełni funkcję kotransmitera lub neuromodulatora wpływającego na perystaltykę. Jednak do weryfikacji tej hipotezy niezbędne są dalsze badania wykorzystujące agonistów i antagonistów CART-u (które w chwili obecnej są nieosiągalne).

W ramach kolejnej publikacji z przedłożonego cyklu (b4) wykazałam, że zarówno w prawym jak i lewym PP samicy świni immunoreaktywność na CART widoczna jest zarówno w ciałach komórkowych neuronów, zakończeniach nerwowych wokół neuronów zwojowych jak i we włóknach nerwowych łączących poszczególne zwoje PP. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy schematem unerwienia CART-ergicznego w zwoju przyszyjkowym jak i

pozostałych zwojach PP. Średni odsetek neuronów Hu C/D-IR/CART-IR w prawych zwojach PP wynosił $4,1 \pm 1,2\%$. Statystycznie podobną wartość odnotowano w lewych zwojach PP ($4,4 \pm 1,6\%$). Zarówno w prawych jak i lewych zwojach PP, dominującą większość (około 95%) ze stwierdzonych neuronów CART-IR stanowiły komórki małe, podczas gdy pozostałe 5% kwalifikowano jako komórki o średniej wielkości. Układ neuronów CART-IR w poszczególnych zwojach nie przedstawiał specyficznej organizacji komórkowej (neurony były równomiernie porozrzucane na terenie zwoju). W pęczkach włókien nerwowych łączących sąsiadujące zwoje PP stwierdzono obecność bardzo licznych, głównie „żyłkowatych” CART-IR włókien nerwowych. Dodatkowo, w poszczególnych zwojach PP występowały liczne lub bardzo liczne CART-IR zakończenia nerwowe biegnące w sąsiedztwie komórek zwojowych. Zasadniczo CART-IR zakończenia nerwowe otaczające CART-negatywne komórki zwojowe tworzyły charakterystyczne „koszyczkowate” struktury. W celu odpowiedzi na pytanie czy CART-IR struktury nerwowe PP samicy świni zawierają neurotransmitery noradrenergiczne lub cholinergiczne zastosowano podwójne barwienia immunohistochemiczne (TH/CART oraz ChAT/CART). Wykazano, że zarówno w CART-IR neuronach PP jak i CART-IR włóknach nerwowych nie występuje TH. CART-IR włókna nerwowe obecne w pęczkach łączących sąsiadujące zwoje PP bardzo często biegły w bardzo bliskim sąsiedztwie włókien TH-IR. Wokół neuronów TH-IR stwierdzano bardzo dużo zakończeń nerwowych CART-IR. Przeprowadzone badania wykazały również, że dominująca większość CART-IR neuronów zwojów PP jak i CART-IR włókien nerwowych (zarówno w zwojach jak i pasmach łączących zwoje) wykazuje ekspresję ChAT, wobec czego uznano je za cholinergiczne. W żadnym ze zbadanych CART-IR włókien nerwowych nie stwierdzono obecności serotoniny, chociaż te dwa typy włókien bardzo często biegły w bliskim sąsiedztwie. Podobnie też, żaden z CART-IR neuronów zwojowych nie wykazywał ekspresji serotoniny. W prawych i lewych zwojach PP, pojedyncze serotonino-IR komórki nerwowe były otaczane przez CART-IR zakończenia nerwowe. W żadnym ze zbadanych neuronów CART-IR nie wykazano obecności PACAP. Podobnie też w żadnym z uwidocznionych PACAP-IR włókien nerwowych nie wykazano ekspresji CART. Pojedyncze PACAP-IR zakończenia nerwowe leżały w bliskim sąsiedztwie CART-IR komórek zwojowych PP. W neuronach prawych i lewych zwojów PP stwierdzono obecność SP, jednak żaden z nich nie zawierał dodatkowo CART. Liczne SP-IR włókna nerwowe regularnie otaczały CART-IR neurony zwojów PP. Jednak zasadniczo schematy rozmieszczenia włókien nerwowych

CART-IR i SP-IR były różne. W bieżących badaniach nie udało mi się wykazać obecności kalbindyny w PP samicy świni. Należy podkreślić, że stwierdzone w niniejszych badaniach liczne CART-IR „koszyczkowate” struktury wokół neuronów zwojowych PP były też obserwowane w innych zwojach obwodowych takich jak zwój szyjny doczaszkowy (Gonsalvez oraz wsp., 2010), zwój szyjno-piersiowy (Dun oraz wsp., 2000), zwój trzewno-krezkowy (Palus oraz Całka, 2016) czy zwój przedni miedniczny (Fenwick oraz wsp., 2006). Przy użyciu tracerów retrogradowych wykazano, że w przypadku zwojów PP szczura, omawiane „koszyczkowate” struktury CART-IR wywodzą się ze współczulnych neuronów przedzwojowych (z ang. *sympathetic preganglionic neurons*; SPN) rdzenia kręgowego (Fenwick oraz wsp., 2006). Co ciekawe wykazano także, że niemal wszystkie CART-IR SPN wykazują ekspresję ChAT (Parker oraz wsp., 2013). Biorąc pod uwagę powyższe można założyć, że obserwowane w PP świni zakończenia nerwowe CART-IR/ChAT-IR są aksonami rdzeniowych SPN, które dobiegają do PP drogą nerwów lędźwiowych trzewnych oraz nerwu podbrzusznego. Jednak w celu weryfikacji tej hipotezy niezbędne są dalsze badania. W celu stwierdzenia czy CART-IR zakończenia nerwowe w PP szczura nie pochodzą z przywspółczulnych neuronów zwojowych (z ang. *parasympathetic preganglionic neurons* PPN) badaniom retrotracingowym poddano segment L₅-S₁ rdzenia kręgowego. Jednak w żadnym z projektujących do PP neuronów PPN nie stwierdzono obecności CART (Fenwick oraz wsp., 2006). Badania elektrofizjologiczne wykazały, że neurony PP komunikujące się ze rdzeniowymi SPN są częścią miednicznego szlaku neuronalnego powodującego rozszerzenie naczyń macicznych (Morris oraz wsp., 2005), co sugeruje rolę CART w regulacji funkcji krążeniowych. Istnieje także możliwość, że CART-IR zakończenia nerwowe otaczające TH-pozytywne neurony PP wywodzą się z interneuronów PP. Takie relacje anatomiczne sugerują, że CART może potencjalnie wpływać na aktywność TH-IR motoneuronów PP zaopatrujących macicę, szyjkę macicy (Houdeau oraz wsp., 1988) czy pęcherz moczowy (de Groat oraz wsp., 2015). Funkcję CART-ergicznych komórek nerwowych działających jako interneurony wykazano uprzednio już w CNS (Równiak oraz wsp., 2010), DRG (Kozsurek oraz wsp., 2007) czy układzie nerwowym jelitowym (Ellis oraz Mawe, 2003). Należy również rozważyć możliwość, że CART-IR cholinergiczne neurony PP projektują do miedniczych narządów wewnętrznych. Takie szlaki nerwowe wykazano uprzednio przy użyciu tracerów retrogradowych (Li oraz Masuko, 2001), zaś obecność CART-ergicznych zakończeń nerwowych chociażby w pęcherzu moczowym wykazałam już uprzednio w pracy (b2). W

trakcie badań nad koekspresją związków biologicznie aktywnych uwidoczniono ciekawy kod chemiczny CART-IR neuronów PP. Wykazano bowiem, że żaden z CART-IR neuronów nie zawiera PACAP, SP, serotoniny oraz kalbindyny. Z drugiej jednak strony istnieją relacje pomiędzy SP-IR czy PACAP-IR włóknami nerwowymi otaczającymi CART-ergiczne neurony PP oraz CART-IR włóknami nerwowymi otaczającymi komórki immunoreaktywne na serotoninę czy SP. Takie relacje anatomiczne sugerują istnienie wzajemnych oddziaływań tych związków w ramach neuromodulacji lub nawet neurotransmisji jednak precyzyjne dane na ten temat są obecnie nieosiągalne. Uprzednio interakcje anatomiczne i funkcjonalne pomiędzy CART a PACAP, CART a serotoniną były wykazane na poziomie centralnym (Burgos i wsp., 2013; Rothmann oraz wsp., 2003), zaś pomiędzy CART a SP zarówno w CNS (Hubert oraz Kuhar, 2005) jak i obwodowo jak wykazałam w pracy (b1).

Zachęcona uzyskanymi wynikami badań z poprzednich prac w kolejnej publikacji (b5) opisałam schemat ekspresji CART w obustronnych przywspółczulnych PPG świni. W pierwszym etapie badań wykazałam, że PPG świni to w rzeczywistości mały splot zawierający jeden duży zwój i parę pomniejszych. Ekspresja CART obecna była w dużym jak i małych zwojach PPG zarówno w ciałach komórkowych neuronów jak i umiarkowanie licznych włóknach zwojowych. Dodatkowo immunoreaktywność na CART obserwowano w pojedynczych włóknach nerwowych biegnących w gałęziach łączących sąsiednie zwoje PPG. W lewym PPG średnio około $4,7 \pm 1,2\%$ neuronów Hu C/D-IR było CART-IR. Statystycznie podobną populację neuronów Hu CD-IR/CART-IR ($5,2 \pm 1,4\%$) stwierdzono w prawym PPG. Dominująca większość (około 80%) z neuronów CART-IR należała do kategorii neuronów średniej wielkości, podczas gdy pozostałe 20% stanowiły komórki małe. Włókna nerwowe CART-IR zasadniczo tworzyły „koszyczkowate” struktury wokół CART-negatywnych neuronów PPG. W obustronnych PPG żaden z neuronów CART-IR nie wykazywał dodatkowo ekspresji galaniny. Włókna nerwowe galanino-IR okazjonalnie biegły w sąsiedztwie włókien CART-IR, jednak włókna CART-IR nie otaczały zwojowych neuronów galanino-IR. Praktycznie wszystkie zbadane neurony CART-IR zawierały VIP, jednak kolokalizacji CART z VIP nie stwierdzono w zwojowych włóknach nerwowych. W neuronach PPG nie stwierdzono obecności SP. Bardzo liczne SP-pozytywne/CART-negatywne włókna nerwowe obecne były w pęczkach włókien łączących sąsiadujące zwoje PPG. Pojedyncze włókna nerwowe SP-pozytywne nie zawierały CART i zasadniczo biegły w odległości od CART-IR włókien nerwowych. W zwojach PPG nie wykazano obecności

somatostatyny, a tym samym jej kolokalizacji z CART. Uzyskane wyniki badań u świń przypominają prezentowany uprzednio schemat unerwienia CART-ergicznego PPG szczura (Ivanusic oraz wsp., 2012), jednak różnią się znacznie od PPG ptaków (kaczki) (Radzimirska oraz wsp., 2016). Można założyć, że obserwowane w PPG CART-IR włókna nerwowe wywodzą się bądź z neuronów jąder CNS bądź z neuronów sąsiadujących zwojów PPG. Dotychczas jednak ekspresję CART odnotowano w strukturach nerwowych CNS innych niż te, o których wiadomo, że projektują do PPG (Li oraz wsp., 2015). Dodatkowo hipotezę o pochodzeniu włókien CART-IR z sąsiadujących zwojów PPG wzmacnia odkrycie obecności włókien CART-pozytywnych w gałęziach komunikujących te zwoje. Dlatego też możliwe jest, że podobnie jak w przypadku innych zwojów obwodowych oraz jąder CNS, neurony CART-IR mogą w PPG świni pełnić funkcję interneuronów. Przy użyciu tracersa Fast Blue wykazano, że u szczurów CART-IR neurony PPG projektują do gruczołu łzowego, a także w nieznacznym stopniu do błony śluzowej jamy nosowej (Ivanusic oraz wsp., 2012), co wskazuje na możliwą rolę tego peptydu jako czynnika sekrecyjnego biorącego udział w produkcji łez lub regulatora krążenia krwi przez gruczoł łzowy. Funkcja naczynioruchowa jest szczególnie prawdopodobna bowiem praktycznie wszystkie neurony CART-IR PPG świni zawierały VIP, który oprócz tego że jest powszechnie obecny w cholinergicznym PPG (Podlasz oraz wsp. 2003) to znany jest jeszcze ze swoich właściwości naczynioaktywnych (Iliff oraz wsp., 2005). W trakcie badań nie wykazano relacji anatomicznych pomiędzy CART-IR neuronami/włóknami nerwowymi PPG a strukturami zawierającymi galaninę, SP czy somatostatynę, co sugeruje znikomy udział tych związków w mechanizmach leżących u podłoża hipotetycznej CART-ergicznnej neurotransmisji lub neuromodulacji.

Wnioski

1. Badania immunohistochemiczne wykazują, że w obustronnych DRG odcinka L₁-L₆ świni stwierdza się około 10% subpopulację neuronów Hu C/D-IR/CART-IR. Dominująca większość (około 75%) spośród Hu C/D-IR neuronów CART-pozytywnych to komórki średniej wielkości, około 20% stanowią neurony małe, zaś jedynie około 5% stanowią neurony dużych rozmiarów.
2. Zidentyfikowane w obustronnych DRG odcinka L₁-L₆ świni neurony CART-IR zawierają w zróżnicowanym stopniu SP, CGRP, LENK oraz kalbindynę, ale nie wykazują ekspresji galaniny. Istnieje zatem anatomiczna podstawa do udziału CART w obwodowych mechanizmach transmisji bodźców bólowych.
3. W zwojach UBT samicy świni obecna jest stosunkowo nieznaczna (średnio około 3%) populacja średniej wielkości neuronów CART-IR. Liczne włókna nerwowe CART-IR otaczają neurony zwojów UBT tworząc charakterystyczne „koszyczkowate” struktury.
4. Wyznakowane CART-IR neurony UBT nie zawierają SP, somatostatyny ani kalbindyny, natomiast wykazują powszechnie ekspresję PACAP. CART-IR włókna nerwowe otaczają przeważnie PACAP-IR neurony BT. Istnieje zatem funkcjonalne powiązanie pomiędzy CART a PACAP w zwojach UBT co sugeruje rolę CART w przywspółczulnej regulacji czynności pęcherza moczowego samicy świni.
5. W poszczególnych badanych anatomicznych częściach żołądka (wpust, trzon oraz odźwiernik) świni występują zróżnicowane odsetki (od 20 do 40%) CART-IR neuronów warstwy mięśniowej, natomiast nie stwierdza się ekspresji CART w neuronach podśluzowych. Liczne włókna nerwowe CART-IR występują w warstwie mięśniowej jak i blaszce mięśniowej błony śluzowej żołądka.
6. Zlokalizowane CART-IR struktury nerwowe żołądka świni zawierają również w dużym stopniu galaninę, w mniejszym SP, zaś nie zawierają NPY. Taki kod chemiczny neuronów CART-IR sugeruje udział tego neuropeptydu w regulacji motoryki i opróżnianiu żołądka świni.
7. W obustronnych zwojach PP samicy świni obecna jest mała (około 5%) subpopulacja CART-ergicznych neuronów. Na terenie PP, ekspresja CART występuje także we włóknach nerwowych otaczających komórki zwojowe jak i we włóknach nerwowych biegnących w pęczkach łączących sąsiadujące zwoje PP.

8. Zasadniczo, obecne w PP CART-IR neurony jak i CART-IR włókna nerwowe zawierają markery cholinergiczne (ChAT) i jednocześnie nie wykazują ekspresji markerów noradrenergicznych (TH). Istnieją wzajemne powiązania anatomiczne pomiędzy zwojowymi neuronami TH-IR a CART-IR zwojowymi włóknami nerwowymi.
9. CART-IR struktury nerwowe w PP świni nie zawierają PACAP, SP, serotoniny ani kalbindyny. Określone wzajemne relacje mikroanatomiczne wskazują na możliwe współdziałanie CART z poszczególnymi związkami biologicznie aktywnymi (za wyjątkiem kalbindyny), chociaż charakter tych interakcji pozostaje nieznany.
10. W zarówno prawym jak i lewym PPG świni obecna jest niewielka subpopulacja (około 5%) neuronów średniej i małej wielkości zawierających CART. Ekspresja CART widoczna jest także we włóknach nerwowych otaczających neurony zwojowe jak i pęczkach włókien łączących sąsiadujące zwoje PPG.
11. CART-IR neurony PPG zawierają VIP, natomiast nie wykazują ekspresji galaniny, SP oraz somatostatyny. Biorąc pod uwagę wygląd oraz charakter biochemiczny neuronów/włókien nerwowych CART-IR możliwe jest, że w PPG świni działają one jako interneurony.

Literatura:

- Arciszewski MB, Barabasz S, Skobowiat C, Maksymowicz W, Majewski M. Immunodetection of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rumen, reticulum, omasum and abomasum of the sheep. *Anat Histol Embryol* 2009; 38: 62-67.
- Arciszewski MB, Całka J, Majewski M. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is expressed in the ovine pancreas. *Ann Anat* 2008; 190: 292-299.
- Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett* 2008; 437: 199-202.
- Burgos JR, Iresjö BM, Smedh U. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38 blocks cocaine- and amphetamine-regulated transcript Peptide-induced hypophagia in rats. *PLoS One* 2013; 8: e72347.
- Burman KJ, Sartor DM, Verberne AJ, Llewellyn-Smith IJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in catecholamine and noncatecholamine presympathetic vasomotor neurons of rat rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 2004; 476: 19-31.
- Chiu HY, Lin HH, Lai CC. Potentiation of spinal NMDA-mediated nociception by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide via PKA and PKC signaling pathways in rats. *Regul Pept* 2009; 158: 77-85.
- Damaj MI, Zheng J, Martin BR, Kuhar MJ. Intrathecal CART (55-102) attenuates hyperalgesia and allodynia in a mouse model of neuropathic but not inflammatory pain. *Peptides* 2006; 27: 2019-2023.
- de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N. Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol* 2015; 5: 327-396.
- Djoughri L, Lawson SN. Aβ-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 46: 131-145.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995; 15: 2471-2481.
- Dun NJ, Dun SL, Kwok EH, Yang J, Chang J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactivity in the rat sympatho-adrenal axis. *Neurosci Lett* 2000; 283: 97-100.
- Ekblad E, Kuhar M, Wierup N, Sundler F. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: distribution and function in rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 545-557.
- Ekblad E. CART in the enteric nervous system. *Peptides* 2006; 27: 2024-2030.
- Ellis LM, Mawe GM. Distribution and chemical coding of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART)-immunoreactive neurons in the guinea pig bowel. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 265-274.

- Fenwick NM, Martin CL, Llewellyn-Smith IJ. Immunoreactivity for cocaine- and amphetamine-regulated transcript in rat sympathetic preganglionic neurons projecting to sympathetic ganglia and the adrenal medulla. *J Comp Neurol* 2006; 495: 422-433.
- Gautron L, Lee CE, Lee S, Elmquist JK. Melanocortin-4 receptor expression in different classes of spinal and vagal primary afferent neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 2012; 520: 3933-3948.
- Gonkowski S, Burliński P, Skobowiat C, Majewski M, Arciszewski MB, Radziszewski P, Całka J. Distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-like immunoreactive (CART-LI) nerve structures in the porcine large intestine. *Acta Vet Hung* 2009a; 57: 509-520
- Gonkowski S., Kamińska B., Burliński P., Kroll A., Całka J.: The influence of drug-resistant colitis on the number of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-like immunoreactive (CART-LI) mucosal nerve fibres of the descending colon in children. *Gastroenterology Rev* 2009b; 4: 147-151.
- Gonsalvez DG, Kerman IA, McAllen RM, Anderson CR. Chemical coding for cardiovascular sympathetic preganglionic neurons in rats. *J Neurosci* 2010; 30: 11781-11791.
- Gu ZF, Pradhan TK, Coy DH, Jensen RT. Smooth muscle cells from guinea pig stomach possess high-affinity galanin receptors that mediate relaxation. *Am J Physiol* 1994; 266: G839-G845.
- Holzer-Petsche U, Lembeck F, Seitz H. Contractile effects of substance P and neurokinin A on the rat stomach in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 1987; 90: 273-279.
- Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'Homme MJ, Rousseau JP. Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J Comp Neurol* 1998; 399: 403-412.
- Hubert GW, Kuhar MJ. Colocalization of CART with substance P but not enkephalin in the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 2005; 1050: 8-14.
- Iliff JJ, Alkayed NJ, Gloschani KJ, Traystman RJ, West GA. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide: a vasoactive role in the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1376-1385.
- Ivanusic JJ, Goulding KE, Kwok MM, Jennings EA. Neurochemical classification and projection targets of CART peptide immunoreactive neurons in sensory and parasympathetic ganglia of the head. 2012; *Neuropeptides* 46: 55-60.
- Janiuk I, Kasacka I. Distribution of cocaine and amphetamine regulated transcript in ureters and urinary bladder of hypertensive rats. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013; 2: 409-416.
- Janiuk I, Młynek K, Wysocki J. Identification and location of the cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in the abomasum of cattle. *Acta Histochem* 2013; 115: 371-375

- Janiuk I, Młynek K. Immunodetection of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in bovine pancreas. *Acta Histochem* 2015; 117: 545-550.
- Jones DC, Lakatos A, Rogge GA, Kuhar MJ. Regulation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression by calcium-mediated signaling in GH3 cells. *Neuroscience* 2009; 160: 339-347.
- Kaleczyc J, Wasowicz K, Klimczuk M, Czaja K, Lakomy M. Immunohistochemical characterisation of cholinergic neurons in the anterior pelvic ganglion of the male pig. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; 41: 65-72.
- Kasacka I, Piotrowska Z. Evaluation of density and distribution of CART-immunoreactive structures in gastrointestinal tract of hypertensive rats. *Biofactors* 2012; 38: 407-415.
- Keast JR. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 2006; 248: 141-208.
- Kozserek M, Lukácsi E, Fekete C, Wittmann G, Réthelyi M, Puskár Z. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 1624-1631.
- Łakomy M, Szatkowska C. Cytoarchitecture of the paracervical ganglion (Frankenhauser) of pig. *Arch Vet Pol* 1992; 32: 31-39.
- Lau J, Herzog H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front Neurosci* 2014; 8: 313.
- Li C, Fitzgerald ME, Del Mar N, Cuthbertson-Coates S, LeDoux MS, Gong S, Ryan JP, Reiner A. The identification and neurochemical characterization of central neurons that target parasympathetic preganglionic neurons involved in the regulation of choroidal blood flow in the rat eye using pseudorabies virus, immunolabeling and conventional pathway tracing methods. *Front Neuroanat* 2015; 9: 65.
- Li MZ, Masuko S. Target specific organization and neuron types of the dog pelvic ganglia: a retrograde-tracing and immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol* 2001; 64: 267-280.
- Morris JL, Gibbins IL, Jobling P. Post-stimulus potentiation of transmission in pelvic ganglia enhances sympathetic dilatation of guinea-pig uterine artery in vitro. *J Physiol* 2005; 566: 189-203.
- Palus K, Całka J. Alterations of neurochemical expression of the coeliac-superior mesenteric ganglion complex (CSMG) neurons supplying the prepyloric region of the porcine stomach following partial stomach resection. *J Chem Neuroanat* 2016; 72: 25-33.
- Parker LM, Kumar NN, Lonergan T, Goodchild AK. Neurochemical codes of sympathetic preganglionic neurons activated by glucoprivation. *J Comp Neurol* 2013; 521: 2703-2718.

- Podlasz P, Wąsowicz K, Kaleczyc J, Łakomy M, Bukowski R. Localization of immunoreactivities for neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes in the pterygopalatine ganglion of the pig. *Vet Med-Czech*. 2003; 48: 99-107.
- Radzimirska M, Bogus-Nowakowska K, Kuder T, Robak A. Distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), neuropeptide Y (NPY) and galanin (GAL) in the pterygopalatine ganglion of the domestic duck (*Anas platyrhynchos f. domestica*). *Folia Histochem Cytobiol* 2016; 54: 25-31.
- Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Cocaine- and amphetamine-related transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 17-24.
- Risold PY, Bernard-Franchi G, Collard C, Jacquemard C, La Roche A, Griffond B. Ontogenetic expression of CART-peptides in the central nervous system and the periphery: a possible neurotrophic role? *Peptides* 2006; 27: 1938-1941.
- Rothman RB, Vu N, Wang X, Xu H. Endogenous CART peptide regulates mu opioid and serotonin 5-HT(2A) receptors. *Peptides* 2003; 24: 413-417.
- Równiak M, Robak A, Bogus-Nowakowska K, Wasilewska B, Najdzion J, Majewski M. The cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) immunoreactivity in the amygdala of the pig. *Anat Histol Embryol* 2010; 39: 385-397.
- Russo AF. Overview of Neuropeptides: Awakening the Senses? *Headache Suppl*. 2017; 2: 37-46.
- Spiess J, Villarreal J, Vale W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 1981; 20: 1982-1988.
- Stein C. Opioids, sensory systems and chronic pain. *Eur J Pharmacol* 2013; 716: 179-187.
- Subhedar NK, Nakhate KT, Upadhya MA, Kokare DM. CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. *Peptides* 2014; 54:108-130.
- Tamas A, Reglodi D, Farkas O, Kovesdi E, Pal J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szanto Z, Doczi T, Buki A, Bukovics P. Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 8430-8448.
- Thim L, Kristensen P, Nielsen PF, Wulff BS, Clausen JT. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2722-2727.
- Tsaknakis A. Morphological studies of the pelvic plexus of the pig. *Zentralbl Veterinarmed A* 1971; 18: 310-324.
- Upadhya MA, Dandekar MP, Kokare DM, Singru PS, Subhedar NK. Evidence for the participation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the fluoxetine-induced anti-hyperalgesia in neuropathic rats. *Peptides* 2011; 32: 317-326.

Uvelius B, Gabella G. The distribution of intramural nerves in urinary bladder after partial denervation in the female rat. *Urol Res* 1998; 26: 291-297.

Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1049: 161-171.

Wierup N, Gunnarsdóttir A, Ekblad E, Sundler F. Characterisation of CART-containing neurons and cells in the porcine pancreas, gastro-intestinal tract, adrenal and thyroid glands. *BMC Neurosci* 2007; 8: 51.

Woźniak W, Skowrońska U. Comparative anatomy of pelvic plexus in cat, dog, rabbit, macaque and man. *Anat Anz* 1967; 120: 457-473.

Yoshiyama M, de Groat WC. The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 227-240.

Zhang M, Han L, Xu Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 586-592.

Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. *Brain Res* 2002; 957: 298-310.

Zvarova K, Vizzard MA. Distribution and fate of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CARTp)-expressing cells in rat urinary bladder: a developmental study. *J Comp Neurol* 2005; 489: 501-517.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Ocena ogólna

Jestem autorem bądź współautorem łącznie **52** publikacji naukowych, w skład których wchodzi **28** oryginalnych prac naukowych oraz **24** doniesień zjazdowych prezentowanych w formie referatów i plakatów zarówno na krajowych jak i zagranicznych konferencjach naukowych. Spośród opublikowanych prac oryginalnych w **9** jestem pierwszym autorem. Spośród wszystkich oryginalnych prac naukowych, aż **23** (co stanowi **85,2%**) zostało opublikowanych w krajowych i zagranicznych czasopismach indeksowanych na liście A *Journal Citation Report* (JCR) (a więc czasopismach posiadających *Impact Factor*; IF). Sumaryczny IF czasopism, które opublikowały artykuły naukowe, w których jestem autorem bądź współautorem wynosi **15,467**. Analogicznie liczona, zsumowana liczba punktów, jakie przyznaje Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) dla czasopism naukowych wynosi dla mojego dorobku naukowego **337**. Aktualny indeks Hirscha (H) liczony wg. bazy Web of Science wynosi **5**. Dotychczasowo moje publikacje były cytowane **74** razy w krajowych i zagranicznych czasopismach z listy A JCR. Dane przedstawione powyżej znajdują potwierdzenie w dokumentacji przygotowanej przez kwalifikowanych pracowników Biblioteki Głównej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i dołączonej w oddzielnym załączniku.

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

Prace oryginalne:

- A.1. Arciszewski MB, Flieger S, **Zacharko A.** *Nucleus intermediomedialis* rdzenia kręgowego w okresie prenatalnym u konia. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio DD* 1999; 54: 1-9.

Punkty MNiSW = 2

Udział szacuję na 30%. Mój wkład polegał na wykonaniu części barwień laboratoryjnych oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu.

- A.2. Arciszewski MB, Flieger S, **Zacharko A**. *Nucleus intermediolateralis* w rdzeniu kręgowym u konia w okresie prenatalnym. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio DD* 1999; 54: 11-17.

Punkty MNiSW = 2

Udział szacuję na 30%. Mój wkład polegał na wykonaniu części barwień laboratoryjnych oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu.

- A.3. Boratyński Z, Flieger S, **Zacharko A**, Strzałka B, Wrona Z, Łuszczewska I. Badania nad lokalizacją ośrodków nerwowych dla jajnika i jajowodu u suki. *Medycyna Weterynaryjna* 1999; 55: 604-607.

Punkty MNSiW = 7, IF = 0,188

Udział szacuję na 15%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu części barwień laboratoryjnych oraz analizie uzyskanych wyników.

- A.4. Boratyński Z, Flieger S, Strzałka B, **Zacharko A**, Wrona Z. Sources of the autonomic and afferent fibres in the horns and body of the uterus in dog. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy* 2000; 44: 79-85.

Punkty MNSiW = 7, IF = 0,250

Udział szacuję na 20%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu barwień laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu.

- A.5. Flieger S, Boratyński Z, **Zacharko A**, Strzałka B, Wrona Z. Localization of the autonomic nerve centres of the uterine cervix in dogs. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy* 2000; 44: 87-93.

Punkty MNSiW = 7, IF = 0,250

Udział szacuję na 20%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu barwień laboratoryjnych, analizie uzyskanych wyników oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu.

- A.6. Jastrzębski M, **Zacharko A**, Krakowska I, Arciszewski MB. Budowa i topografia przywspółczulnego oraz dwuznacznego jądra nerwu językowo-gardłowego i

błędno u renifera (*Rengifer tarandus L.*). Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio C 2000; 50: 19-24.

Punkty MNiSW = 3

Udział szacuję na 20%. Mój wkład polegał na wykonaniu części barwień laboratoryjnych oraz współpracy przy przygotowaniu manuskryptu.

- A.7. Boratyński Z, Flieger S, Arciszewski MB, **Zacharko A**, Strzałka B. Autonomiczne ośrodki nerwowe unerwiające gruczoł sutkowy u suki. Acta Scientiarum Polonorum – Medicina Veterinaria 2002; 1: 97-106.

Punkty MNiSW = 4

Udział szacuję na 10%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach operacyjnych oraz wykonaniu części barwień laboratoryjnych.

- A.8. Boratyński Z, Flieger S, **Zacharko A**, Strzałka B, Arciszewski MB, Matysek M. Afferentne ośrodki nerwowe gruczołu sutkowego u suki. Acta Scientiarum Polonorum – Medicina Veterinaria 2003; 2: 3-10.

Punkty MNiSW = 4

Udział szacuję na 10%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach operacyjnych oraz wykonaniu części barwień laboratoryjnych.

- A.9. Arciszewski MB, **Zacharko A**. Distribution of sympathetic and afferent neurones innervating the submandibular gland in the sheep. Anatomia Histologia Embryologia 2003; 32: 316-319.

Punkty MNiSW = 11, IF = 0,709

Udział szacuję na 40%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach iniekcji tracera, pobieraniu materiału badawczego, współredakcji manuskryptu.

Doniesienia zjazdowe:

- A.10. Flieger S, Boratyński Z, Strzałka B, **Zacharko A**. Eksperymentalne badania nad lokalizacją ośrodków nerwowych autonomicznych dla narządów rozrodczych i gruczołu sutkowego u suki. Sesja naukowa - Stan badań naukowych w weterynarii w świetle wyników uzyskanych w zakończonych i realizowanych projektach badawczych finansowanych przez KBN. Puławy, 1998, 10-11 grudzień 1998, Materiały sesji naukowej s. 8

- A.11. Arciszewski MB, Flieger S, **Zacharko A**. Sympathetic and parasympathetic centres in the spinal cord of the horse in prenatal period. XVIIIth Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Łódź, 25-28 Czerwiec 1999, Folia Morphologica (Warsz.) Suppl. 1: 58.
- A.12. **Zacharko A**, Flieger S, Boratyński Z, Strzałka B, Wrona Z, Łuszczewska I. Experimental investigation on localization of nerve centres in ovary and oviduct in dog. XVIIIth Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Łódź, 25-28 Czerwiec 1999, Folia Morphologica (Warsz.) Suppl. 1: 58.
- A.13. Strzałka B, Flieger S, Boratynski Z, **Zacharko A**, Wrona Z, Łuszczewska I. Experimental investigation on the localization of the nerve centres in horns and uterus body in dog. XVIIIth Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Łódź, 25-28 Czerwiec 1999, Folia Morphologica (Warsz.) Suppl. 1: 58.
- A.14. Arciszewski MB, Flieger S, **Zacharko A**. *Nucleus parasympathicus nervi vagi et glossopharyngei* u ptaków. XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 21-23 Wrzesień 2000, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio DD 55/A: 31.
- A.15. Boratyński Z, Flieger S, Strzałka B, Wrona Z, **Zacharko A**, Łuszczewska I. Doświadczalne badania nad lokalizacją ośrodków nerwowych dla jajnika i jajowodu u suki. XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 21-23 Wrzesień 2000, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio DD 55/A: 36.
- A.16. Flieger S, Strzałka B, **Zacharko A**, Wrona Z. Badania nad lokalizacją ośrodków nerwowych dla rogów i trzonu macicy u suki. XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 21-23 Wrzesień 2000, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska sectio DD 55/A: 43.
- A.17. **Zacharko A**, Arciszewski MB, Flieger S. Structure and topography of motor nucleus of the facial nerve in the parrot. XXIII Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Olsztyn, 16-19 July 2000, Poland, Polish Journal of Veterinary Sciences, Suppl. 3: 53.
- A.18. Arciszewski MB, Flieger S, **Zacharko A**. Structure and localization of *nucleus parasympathicus nervi IX et X* in parrot. XIXth Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Wrocław, 24-26 Czerwiec 2001, Folia Morphologica (Warsz.) 60: 173.
- A.19. Flieger S, Boratyński Z, **Zacharko A**, Strzałka B, Wrona Z. Localization of the autonomic nerve centres of the uterine cervix in dog. XIXth Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Wrocław, 24-26 Czerwiec 2001, Folia Morphologica (Warsz.) 60: 123.
- A.20. Arciszewski MB, **Zacharko A**. Kolokalizacja TH i DβH we współczulnych neuronach zaopatrujących śliniankę podżuchwową u owcy. XXXIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Wrocław, 18-20 Wrzesień 2003, Streszczenia str. 4

Po rozpoczęciu pracy w charakterze asystenta naukowo badawczego zostałam włączona do projektów naukowych realizowanych w ówczesnym zespole prof. dr hab. Stanisława Fliegera. Mój dorobek naukowy z okresu poprzedzającego uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych obejmuje **20** publikacji naukowych. W zakres tego dorobku wchodzi **9** prac oryginalnych opublikowanych w krajowych i zagranicznych czasopismach naukowych. Spośród wymienionych publikacji **4** opublikowane są w czasopismach indeksowanych na liście A bazy JCR. Sumaryczny IF dla tych czasopism wynosi **1,397**, zaś liczba punktów jakie ówczesnie przyznawało MNiSW za publikacje naukowe wynosi **47**. Dorobek uzupełnia **11** doniesień zjazdowych prezentowanych podczas krajowych kongresów naukowych. W trakcie mojej dotychczasowej pracy naukowej wszystkie moje zainteresowania badawcze koncentrowały się wokół aspektów związanych z budową szeroko pojętego układu nerwowego (neuroanatomia). Stąd też pierwsze swoje szlify naukowe zdobywałam opisując

w tradycyjny sposób struktury CNS zwierząt domowych i dzikożyjących, przy czym prace te oprócz wartości naukowej jednocześnie służyły jako narzędzie do nauki i poprawy mojego warsztatu naukowego. Jednocześnie swoją pracę naukową prowadziłam biorąc udział jako wykonawca w realizacji, kierowanych przez prof. dr hab. Stanisława Fliegera, dwóch projektów grantowych uzyskanych z ówczesnego KBN. Głównym celem tych projektów było eksperymentalne ustalenie źródeł unerwienia autonomicznego (współczulnego) dla poszczególnych narządów układu rozrodczego oraz gruczołu sutkowego suki. W okresie tuż przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych podjęłam (trwającą do dziś) współpracę z prof. dr hab. Marcinem Arciszewskim, w ramach której wspólnie poszukiwaliśmy m.in. źródeł unerwienia eferentnego i aferentnego ślinianki podżuchwowej owcy.

Jednym z moich pierwszych celów badawczych było opisanie lokalizacji i struktury komórkowej ośrodków autonomicznego układu nerwowego (jądra pośrednio-bocznego i jądra pośrednio-przyśrodkowego) u konia w okresie prenatalnym (A.1, A.2, A.11). Do realizacji tych badań wykorzystano klasyczne metody barwień histologicznych preparatów parafinowych (Nissla oraz Klüvera-Barrera) wykonanych z rdzenia kręgowego. Swoje zainteresowania budową autonomicznego układu nerwowego na poziomie centralnym kontynuowałam badając lokalizację i budowę jąder nerwowych CNS ssaków i ptaków. Przy użyciu metod analogicznych jak powyżej zostały scharakteryzowane pod kątem anatomicznym jądra przywspółczulne oraz dwuznaczne nerwu językowo-gardłowego i błędnego u renifera (A.6) i niektórych ptaków (A.14, A.18) czy jądro ruchowe nerwu twarzowego papugi (A.17).

Kolejnym kierunkiem badań, w którym uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych były kwestie związane z unerwieniem żeńskich narządów rozrodczych. Do realizacji badań posłużono się stosowaną ówczynie przez zespół prof. dr hab. Stanisława Fliegera techniką tzw. „degeneracji wstecznej”. Metoda ta zakładała, że po eksperymentalnym usunięciu badanego narządu dochodzi jednocześnie do aksotomii unerwiających go komórek nerwowych. Wobec tego dochodzi także do zamian degeneracyjnych w zwojach nerwowych stanowiących potencjalne źródło unerwienia badanego narządu. Lokalizacja morfologicznie zdegenerowanych komórek zwojowych w określonym okresie poekstirpacyjnym pozwalała na odpowiedź o źródła unerwienia narządu. W ten sposób badano u suki źródła unerwienia

autonomicznego dla jajnika i jajowodu (A.3, A.10, A.12, A.15), rogów i trzonu macicy (A.4, A.13, A.16) oraz szyjki macicy (A.5, A.19). W oddzielnym eksperymencie badano też źródła unerwienia autonomicznego (A.7) i czuciowego (A.8) dla gruczołu stukowego suki.

Po uzyskaniu doświadczenia w technice preparacyjnej i wiedzy z zakresu budowy układu nerwowego doskonaliłam swój warsztat naukowy poprzez kontakty naukowe, które zaowocowały stażem naukowym w kierowanej przez prof. dr hab. Mirosława Łakomego, Katedrze Morfologii Funkcjonalnej, UWM w Olsztynie. Tam też poznałam technikę wstecznego znakowania neuronów przy użyciu fluorescencyjnych tracerów neuronalnych (m.in. Fast Blue; FB) i technikę pojedynczych i podwójnych barwień immunohistochemicznych z wykorzystaniem przeciwciał mono- i poliklonalnych. Zdobytą wiedzę wykorzystałam do ustalenia źródeł pochodzenia eferentnych (współczulnych) oraz aferentnych (czuciowych) neuronów zaopatrujących śliniankę podżuchwową owcy (A.9). Równocześnie przy użyciu podwójnych barwień immunofluorescencyjnych zainicjowałam prace nad kodowaniem chemicznym współczulnych neuronów zaopatrujących śliniankę podżuchwową owcy głównie pod kątem ekspresji w nich markerów toru syntezy katecholamin (A.20). Finalnie, zdobyte umiejętności i doświadczenie badawcze wykorzystałam do realizacji pracy doktorskiej pod kierunkiem dr hab. Zbigniewa Boratyńskiego. Rozprawa doktorska pt. „Ustalenie autonomicznych oraz trzewno-czuciowych ośrodków nerwowych dla gruczołu krokowego psa” miała na celu ustalenie przy użyciu tracera retrogradowego FB, które ze współczulnych i czuciowych zwojów nerwowych stanowią źródło unerwienia gruczołu krokowego psa. Jednocześnie wyznakowane wstecznie neurony FB-pozytywne charakteryzowano określając ich kodowanie chemiczne, tj. precyzując zakres występowania neurotransmiterów i neuropeptydów.

B. Wykaz i omówienie publikacji naukowych opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Prace oryginalne:

- B.1. Arciszewski MB, **Zacharko A**, Lalak R. Co-expression of tyrosine hydroxylase, dopamine beta-hydroxylase and neuropeptide Y in the sympathetic neurons projecting to the submandibular gland in the sheep. *Anatomy and Embryology* 2004; 208: 161-167.

Punkty MNiSW = 20, IF = 1,559

Udział 30%. Mój wkład polegał na współudziale przy zabiegach iniekcji tracera, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, współredakcji manuskryptu.

- B.2. **Zacharko A**, Arciszewski MB, Wąsowicz K. Origin of the primary efferent neurons projecting to the prostate of the dog. *Annals of Anatomy* 2004; 186: 349-356.

Punkty MNiSW = 10, IF = 0,540

Udział 60%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, iniekcji tracera retrogradowego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, opracowaniu statystycznym uzyskanych wyników, redakcji manuskryptu.

- B.3. Arciszewski MB, **Zacharko A**. Origin and chemical coding of primary afferent neurones supplying the prostate of the dog. *Anatomia Histologia Embryologia* 2004; 33: 326-333.

Punkty MNiSW = 10, IF = 0,625

Udział 70%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, iniekcji tracera retrogradowego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, opracowaniu statystycznym uzyskanych wyników, redakcji manuskryptu.

- B.4. Flieger S, Arciszewski MB, **Zacharko A**. Włókna nerwowe SP-immunoreaktywne w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka. *Medycyna Weterynaryjna* 2004; 60: 1110-1113.

Punkty MNiSW = 7, IF = 0,285

Udział 30%. Mój wkład polegał na pobraniu materiału, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji i opracowaniu uzyskanych wyników, redakcji manuskryptu.

- B.5. Arciszewski MB, **Zacharko-Siembida A**. A co-localization study on the ovine pancreas innervation. *Annals of Anatomy* 2007; 189: 157-167.

Punkty MNiSW = 10, IF = 0,817

Udział 40%. Mój wkład polegał na pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, dokumentacji wyników badań.

- B.6. Arciszewski MB, **Zacharko-Siembida A**. Cholinergic innervation of the pancreas in the sheep. *Acta Biologica Hungarica* 2007; 58: 151-162.

Punkty MNiSW = 10, IF = 0,447

Udział 40%. Mój wkład polegał na, pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, dokumentacji wyników badań.

- B.7. Arciszewski MB, Stefaniak M, **Zacharko-Siembida A**, Całka J. Aquaporin 1 water channel is expressed on submucosal but not myenteric neurons from the ovine duodenum. *Annals of Anatomy* 2011; 193: 81-85.

Punkty MNiSW = 20, IF = 1,861

Udział 20%. Mój wkład polegał na pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu hodowli neuronalnych i barwień immunohistochemicznych, dokumentacji wyników badań.

- B.8. **Zacharko-Siembida A**, Valverde Piedra JL, Szymańczyk S, Arciszewski MB. Immunolocalization of NOS, VIP, galanin and SP in the small intestine of suckling pigs treated with red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Acta Histochemica* 2013;115: 219-225.

Punkty MNiSW = 15, IF = 1,760

Udział 60%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, pobieraniu materiału badawczego, wykonywaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji uzyskanych wyników, współredakcji manuskryptu.

- B.9. **Zacharko-Siembida A**, Valverde Piedra JL, Arciszewski MB. Changes in expression of calbindin 28 kDa in the small intestine of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-treated suckling piglets. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2013; 16: 201-209.

Punkty MNiSW = 20, IF = 0,712

Udział 60%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, pobieraniu materiału badawczego, wykonywaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji uzyskanych wyników, współredakcji manuskryptu.

- B.10. **Zacharko-Siembida A**, Valverde Piedra JL, Strzałka B, Arciszewski MB. Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin stimulation increases the number of enterochromaffin cells in the small intestine of suckling piglets. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy* 2014; 58: 289-294.

Punkty MNiSW = 15, IF = 0,357

Udział 60%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, pobieraniu materiału badawczego, wykonywaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji uzyskanych wyników, współredakcji manuskryptu.

- B.11. Matysek M, Mozel S, Szalak R, **Zacharko-Siembida A**, Obszańska K, Arciszewski MB. Effect of feeding with bilberry fruit on the expression pattern of α CaMKII in hippocampal neurons in normal and diabetic rats. Polish Journal of Veterinary Sciences 2017; 20: 313-319.

Punkty MNiSW = 20, IF₂₀₁₆ = 0,697

Udział 20%. Mój wkład polegał na pobieraniu materiału badawczego i wykonaniu analizy statystycznej.

- B.12. Kulik P, **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. The localization of primary efferent sympathetic neurons innervating the porcine thymus – a retrograde tracing study. Acta Veterinaria Brno 2017; 86: 117-122.

Punkty MNiSW = 20, IF₂₀₁₆ = 0,415

Udział 40%. Mój wkład polegał na wykonaniu zabiegu iniekcji tracera, pobieraniu materiału badawczego i współredakcji manuskryptu.

- B.13. Sienkiewicz W, Dudek A, **Zacharko-Siembida A**, Marszałek M. Immunohistochemical characterization of the jugular (superior vagal) ganglion in the pig. Polish Journal of Veterinary Sciences 2017; 20: 377-385.

Punkty MNiSW = 20, IF₂₀₁₆ = 0,697

Udział 25%. Mój wkład polegał na wykonaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji wyników badań.

- B.14. Górska A, **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Leucine-enkephalin is co-expressed with substance P, galanin and somatostatin in the ovine pancreas. Veterinarski Arhiv 2017; 87: 585-595.

Punkty MNiSW = 15, IF₂₀₁₆ = 0,302

Udział 40%. Mój wkład polegał na pobieraniu materiału badawczego, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji wyników badań.

Doniesienia zjazdowe:

- B.15 Arciszewski MB, **Zacharko A**, Lalak R. Neuropeptide Y expression in the noradrenergic neurons projecting to the submandibular gland in the sheep. A combined retrograde tracing and immunohistochemistry study. 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, 5-10 September 2004, Czech Republic, Journal of Peptide Science 10 (Suppl.): 169.
- B.16 Zacharko-Siembida A. Distribution of SP-immunoreactive neuronal elements in the pancreas of the sheep. Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i XLII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Poznań, 5-7 Wrzesień 2007, Folia Morphologica (Warsz.) 66: 262.
- B.17 Arciszewski MB, **Zacharko-Siembida A**. AQP1 is expressed in ENS of the ovine duodenum. XXVIIIth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Paris, 28-31 July 2010, France, Anatomia Histologia Embryologia 39: 263.
- B.18. **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Ekspresja peptydu uwalniającego gastrynę (GRP) w trzustce owcy. XLV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Lublin, 12-14 Wrzesień 2011, Materiały konferencyjne str. 99.
- B.19 **Zacharko-Siembida A**, Valverde Piedra JL, Szymańczyk S, Arciszewski MB. Changes in neuropeptides expression in enteric neurons of the small intestine of lectin-stimulated piglets. XXXI Congress of the Polish Anatomical Society, Dolina Charlotty, 27-30 Czerwiec 2013, Materiały konferencyjne str. 36
- B.20 **Zacharko-Siembida A**, Kulik P, Arciszewski MB. Coexpression of CART with SP, GRP, NPY and galanin in the stomach of the wild boar. XXXI Congress of the Polish Anatomical Society, Dolina Charlotty, 27-30 Czerwiec 2013, Materiały konferencyjne str. 94
- B.21 **Zacharko-Siembida A**, Kulik P, Szalak R, Lalak R, Arciszewski MB. Immunoreactivity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the lumbar dorsal root ganglia of the pig. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, Olsztyn, 4-6 wrzesień 2013, Materiały konferencyjne str. 96
- B.22 **Zacharko-Siembida A**, Valverde Piedra JL, Arciszewski MB. The expression of calbindin D-28k in the small intestine of lectin-treated piglets. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, Olsztyn, 4-6 wrzesień 2013, Materiały konferencyjne str. 97
- B.23 **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Changes in expression of serotonin in the small intestine of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-stimulated suckling piglets. XXXth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Cluj-Napoca, Romania 23-26 July 2014, Anatomia Histologia Embryologia 43 (Suppl. 1): 99
- B.24 **Zacharko-Siembida A**, Kulik P, Arciszewski MB. Localization of Fast Blue- and DiI-labelled efferent sympathetic neurons projecting to the thymus of the pig. XXIV International Symposium on Morphological Sciences, Istanbul, Turkey, 2-6 September 2015, Anatomy 2015; 9 (Suppl 2): S133.
- B.25 Matysek M, Mozel S, Szalak R, **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Immunoreactivity to α CaMKII in the entorhinal cortex in rats fed with bilberry fruit. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 22-24 września 2016, Materiały kongresowe str. 52
- B.26 Olejarska A, **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Leucine-enkephalin immunoreactivity in the ovine pancreas. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin, 22-24 września 2016, Materiały kongresowe str. 52

- B.27 Radlińska A, **Zacharko-Siembida A**, Arciszewski MB. Immunoreactivity to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the pelvic ganglia of the pig. XXXIth Conference of the European Association of Veterinary Anatomists, Viena, Austria, 27-30 July 2016, Anatomia Histologia Embryologia 45 (Suppl. 1): 64-65

Całościowo mój dorobek naukowy z okresu po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych obejmuje **32** publikacji naukowych. Do dorobku tego zalicza się **19** prac oryginalnych (z czego **5** prac stanowi osiągnięcie w rozumieniu w art. 16. ust 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”), opublikowanych wyłącznie w czasopismach naukowych z listy JCR. Sumaryczny IF dla tych czasopism wynosi **14,445**, zaś liczba punktów MNiSW za publikacje naukowe wynosi **290**. Dorobek uzupełnia **13** doniesień zjazdowych prezentowanych podczas krajowych i międzynarodowych kongresów naukowych. Biorąc pod uwagę przedstawione parametry bibliometryczne mojego dorobku naukowego, mogę śmiało stwierdzić, że został on zwielokrotniony w okresie po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych, co ilustruje tabela poniżej.

	przed nadaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych			po nadaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych		
<u>Prace oryginalne</u>	Liczba	Sum IF	Punkty MNiSW	Liczba	Sum IF	Punkty MNiSW
Czasopisma z listy A bazy JCR	4	1,397	32	19	14,070	290
Pozostałe czasopisma	5	-	15	0	-	-
Razem	<u>9</u>	<u>1,397</u>	<u>47</u>	<u>19</u>	<u>14,070</u>	<u>290</u>
<u>Komunikaty zjazdowe</u>	Ilość			Ilość		
Krajowe	11			8		
Zagraniczne	0			5		
Razem	<u>11</u>			<u>13</u>		

W mojej bieżącej pracy naukowej, (tj. od momentu uzyskania stopnia doktora nauk weterynaryjnych do chwili obecnej) daje się wyróżnić 4 podstawowe problemy badawcze. Dominującą większość z moich badań przeprowadziłam we współpracy z prof. dr hab. Marcinem Arciszewskim. Zagadnienia, którymi się interesowałam w szerokim kontekście dotyczyły:

1. Ustalenia źródeł wyjścia aferentnych i eferentnych włókien nerwowych zaopatrujących narządy wewnętrzne zwierząt domowych
2. Badań nad ekspresją związków biologicznie aktywnych w narządach wewnętrznych
3. Wpływu czynników żywieniowych na ekspresję związków biologicznie aktywnych w neuronach obwodowego i centralnego układu nerwowego
4. Badań kodu chemicznego neuronów zwojów nerwu błędnego

Ad. 1. Zaraz po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych moja aktywność naukowa skoncentrowała się w pierwszej kolejności na kontynuacji rozpoczętego projektu grantowego dotyczącego kwestii pochodzenia i kodowania chemicznego neuronów zaopatrujących śliniankę podżuchwową owcy. Jak wspomniałam pierwszy etap badań mający na celu wyznaczenie przy użyciu tracera FB neuronów współczulnych i czuciowych zaopatrujących

gruczoł został zakończony przed uzyskaniem przeze mnie stopnia doktora. Dlatego kolejnym etapem badań była charakterystyka immunohistochemiczna neuronów FB-pozytywnych obecnych w zwoju szyjnym doczaszkowym (z ang. *superior cervical ganglion*; SCG) oraz zwoju szyjnym środkowym (z ang. *middle cervical ganglion*; MCG) owcy pod kątem zawartości neurotransmiterów i neuropeptydów (**B.1**, **B.15**). Badania pozwoliły na wykazanie, że zarówno w SCG jak i MCG istnieją wtórne subpopulacje neuronów FB-pozytywnych. Dominująca większość (około 90-97,5%) z neuronów zaopatrujących śliniankę to neurony noradrenergiczne, bowiem wykazują jednoczesną ekspresję TH oraz D β H. Nieznaczna subpopulacja neuronów FB-pozytywnych nie zawierała obu markerów noradrenergicznych (około 2,5% w SCG oraz 10% w MCG). W dalszej kolejności populacja FB-pozytywnych neuronów noradrenergicznych została podzielona wtórnie, mniej więcej po połowie, na subpopulację zawierającą dodatkowo NPY bądź też nie. Jednak w obydwu badanych zwojach stwierdzono także niewielkie odsetki neuronów FB-pozytywnych zawierających NPY, ale nie TH (około 2,5% w SCG oraz około 7% w MCG). Ostatnią subpopulację neuronów FB-pozytywnych stanowiły te, które nie zawierały ani TH ani NPY (2-6%). Kolejnym etapem pracy naukowej było zbadanie przy użyciu podwójnych barwień immunohistochemicznych jakie związki biologicznie aktywne obecne są w neuronach eferentnych oraz aferentnych projektujących do gruczołu krokowego psa (**B.2**, **B.3**). Do znakowania neuronów zaopatrujących prostatę użyto tracera retrogardowego FB. FB-pozytywne neurony zwoju kręzkowego doogonowego (z ang. *caudal mesenteric ganglion*, CaMG), zwojów pnia współczulnego oraz zwojów PP badano na obecność w nich TH oraz D β H. Wyniki wskazały na źródła pochodzenia neuronów eferentnych unerwiających prostatę psa oraz uwiłocznili udział poszczególnych zwojów w całościowym eferentnym unerwieniu narządu. Dodatkowo wykazano, że w badanych zwojach współczulnych ponad 95% FB-pozytywnych neuronów to neurony noradrenergiczne, podczas gdy w PP odsetek FB-pozytywnych neuronów immunoreaktywnych na TH i D β H wynosił około 70% (co sugeruje, że pozostałe neurony FB-pozytywne mogą mieć cholinergiczny charakter). W dalszym etapie, przeprowadzone badania nad pochodzeniem i kodem chemicznym neuronów aferentnych unerwiających prostatę psa uwiłocznili populację FB-pozytywnych neuronów w DRG odcinka L₂-L₄ (około 60%) oraz S₁-Ca₁ (około 40%). Analiza kodowania chemicznego wyznakowanych neuronów wykazała powszechną w nich obecność SP oraz CGRP (od około 40% do 50% wszystkich badanych neuronów). Neurony FB-pozytywne zawierające tylko

jeden z badanych związków (bądź SP bądź CGRP) stanowiły nieznaczne około 15% subpopulacje. Dodatkowe barwienia uwidocznily, że galanina obecna jest jedynie w średnio około 10% subpopulacji neuronów FB-pozytywnych i związek ten powszechnie współwystępuje z SP. Następne badania tracingowe dotyczyły kwestii eferentnego unerwienia grasicy świni (**B.12**, **B.24**). W eksperymencie tym zastosowano dwa różne tracery retrogradowe (tj. FB oraz DiI), które były wstrzykiwane do różnych płatów grasicy. Analiza z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego wykazała, że neurony FB-pozytywne obecne były w unilateralnym SCG (około 80%) oraz MCG (około 20%), podczas gdy neurony DiI-pozytywne lokalizowały się (w podobnych proporcjach jak w przypadku FB) w unilateralnych SCG i MCG, z tą różnicą że dodatkowo około 1,5% wyznakowanych neuronów obecnych było w unilateralnym zwoju szyjno-piersiowym (z ang. *cervicothoracic ganglion*; CTG). Badania wskazały na znaczenie doboru odpowiedniego tracera do badań nad unerwieniem grasicy.

Ad. 2. Nie mniej istotną od kwestii lokalizacji neuronów zwojowych zaopatrujących poszczególne narządy wewnętrzne jest kwestia rozmieszczenia i kodu chemicznego włókien nerwowych w samych narządach. Bardzo często położenie włókien nerwowych oraz ich kod chemiczny determinuje wpływ układu nerwowego na czynność narządu. Dlatego też w ramach prowadzonych przeze mnie badań podjęłam się ustalenia schematu dystrybucji włókien nerwowych SP-immunoreaktywnych w gruczołach opuszkowo-cewkowych samca owcy (**B.4**). Analiza mikroskopowa wykazała, że w gruczołach opuszkowo-cewkowych tryka obecne są jedynie pojedyncze włókna SP-IR położone w warstwie śluzowej oraz warstwie mięśniowej, a także nieliczne włókna koncentrujące się wokół naczyń krwionośnych. Badania kolokalizacyjne wykazały, że dominująca większość z badanych włókien dodatkowo zawiera CGRP. Z kolei część z uwidocznionych CGRP-IR włókien nerwowych nie zawierała SP. Wyniki badań wskazują na czuciowe pochodzenie tych włókien jednak ze względu na lokalizację możliwy jest także udział SP w regulacji kurczliwości naczyń krwionośnych gruczołów opuszkowo-cewkowych tryka. Problematyka noradrenergicznego, cholinergicznego oraz peptydergicznego wewnątrzpochodnego unerwienia trzustki owcy stanowiła punkt wyjścia do kolejnych badań (**B.5**, **B.6**, **B.14**, **B.16**, **B.18**, **B.26**). Przy zastosowaniu uprzednio już wykorzystywanych markerów noradrenergicznych możliwe było wykazanie, że wyspy, pęcherzyki, tkanka łączna śródpłatowa jak i naczynia krwionośne trzustki owcy (ale nie przewody wyprowadzając) są obficie zaopatrzone we włókna nerwowe

TH-IR/D β H-IR. Z kolei włókna nerwowe cholinergiczne (zawierające pęcherzykowy nośnik acetylocholiny; VACHT) obecne były przede wszystkim wokół pęcherzyków i w tkance łącznej śródplotowej. Zastosowanie szerokiego spektrum przeciwciał skierowanych przeciwko neuropeptydom pozwoliło na wizualizację w poszczególnych częściach trzustki owcy włókien nerwowych zawierających NPY, VIP, SP, CGRP, GRP, enkefaliny oraz ich wzajemne relacje w stosunku do włókien noradrenergicznych i cholinergicznych. Wyniki badań jednoznacznie wskazują na możliwy zróżnicowany wpływ neuropeptydów na czynność egzokrynną i endokrynną trzustki owcy. Specyficzny kod chemiczny włókien nerwowych obecnych w trzustce owcy sugeruje istnienie wzajemnych interakcji pomiędzy neuropeptydami wpływających na czynność sekrecyjną narządu. Jednym z ciekawszych i szeroko cytowanych moich badań było ustalenie czy w dwunastnicy owcy znajdują się struktury immunoreaktywne na związki z rodziny akwaporyn (z ang. *aquaporins*; AQP), a precyzyjnie na akwaporynę 1 (AQP1). Opublikowane wyniki badań (**B.7**, **B.17**) wskazują, że *in vivo* ekspresja AQP1 obecna jest w około 30% neuronów podśluzowych dwunastnicy, które dodatkowo zawierają SP (ale nie VIP). Żaden z badanych neuronów warstwy mięśniowej dwunastnicy nie zawierał AQP1. Ekspresja AQP1 została także uwidoczniiona w ścianie małych naczyń krwionośnych/limfatycznych warstwy podśluzowej dwunastnicy owcy. W celu odpowiedzi na pytanie czy AQP1 bierze udział w procesach neuroprotekcyjnych wykorzystano pierwotne hodowle neuronalne *in vitro*. Jednak po 3, 6 i 9 dniach hodowli *in vitro*, żaden z hodowanych neuronów warstwy mięśniowej nie wykazywał ekspresji AQP1, co sugeruje, że kanał ten nie uczestniczy w procesach plastyczności neuronalnej. Kod chemiczny włókien nerwowych i neuronów układu nerwowego jelitowego badałam także w odniesieniu do zwierząt dzikożyjących, takich jak dzik (**B.20**).

Ad 3. Do podjęcia prac nad kolejnymi zagadnieniami badawczymi skłoniły mnie doniesienia wykazujące, że składniki żywieniowe mogą efektywnie wpływać na procesy związane z plastycznością neuronów zarówno centralnego jak i obwodowego układu nerwowego. W ten sposób poprzez dostosowaną dietę można starać się przyspieszać np. procesy związane z dojrzewaniem przewodu pokarmowego lub ogólnie z pamięcią długo i krótkotrwałą. Jednym z takich związków, który zwraca od jakiegoś czasu uwagę badawczy jest lektyna (uzyskiwana z fasoli czerwonej - *Phaseolus vulgaris*). W ramach prowadzonego eksperymentu, trzydniowym prosiętom podawano jednorazowo wyciąg z lektyny i badano fragmenty jelita cienkiego (dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita ślepego) pod kątem ekspresji związków

biologicznie aktywnych. Okazało się, że lektyna nie wpływa na zawartość w neuronach warstwy mięśniowej jelita cienkiego neurotrasmieterów/neuropeptydów takich jak: syntetaza tlenu azotu (z ang. *nitric oxide synthase*; NOS), VIP, SP czy galanina. Jednak podanie lektyny spowodowało wyraźny wzrost ekspresji NOS i spadek ekspresji VIP w neuronach podśluzowych jelita cienkiego. Dodatkowo za wyjątkiem dwunastnicy w neuronach podśluzowych obserwowano wzrost ekspresji galaniny oraz spadek ekspresji SP. Uzyskane wyniki sugerują, że regulacja neuronalna poprzez użycie lektyny może mieć duży wpływ na przebudowę przewodu pokarmowego prosiąt w okresie odsadzeniowym (**B.8, B.19**). W kolejnym etapie badań u prosiąt, którym podawano lektynę badano poziom ekspresji kalbindyny w poszczególnych odcinkach jelita cienkiego. Badania wykazały, że w dwunastnicy i jelicie czczym (ale nie jelicie ślepym) zwierząt eksperymentalnych wystąpił wzrost ekspresji kalbindyny w neuroendokrynnych (NE) komórkach immunoreaktywnych na chromograninę A (marker komórek NE). W badaniach kolokalizacyjnych wykazano, że mała populacja (około 5%) kalbindyno-pozytywnych komórek NE zawiera także somatostatynę. Badane komórki nie zawierały natomiast serotoniny, histaminy ani czynnika uwalniającego kortykotropinę (z ang. *corticotrophin releasing factor*, CRF). Zmian w ekspresji kalbindyny nie odnotowano w układzie nerwowym jelitowym. W ten sposób odkryto nieznaną mechanizm interakcji pomiędzy podaniem lektyny a ekspresją kalbindyny w komórkach NE u prosiąt w okresie odsadzeniowym (**B.9, B.22**). Moje zainteresowanie wzbudziło także pytanie czy poziom ekspresji serotoniny obecnej w komórkach enterochromafinowych (EC) jelita cienkiego może ulegać zmianom po oddaniu lektyny. Wyniki badań wykazały, że stymulacja lektyną spowodowała wzrost ilości komórek EC jedynie w dwunastnicy prosiąt, ale już nie w jelicie czczym i jelicie biodrowym. Co więcej stymulacja lektyną nie wpłynęła na poziom zawartości somatostatyny w komórkach EC dwunastnicy. U zwierząt kontrolnych nie stwierdzono ekspresji CRF w nabłonku jelita cienkiego, a stymulacja lektyną także nie spowodowała widocznego wzrostu ekspresji tego związku. Uzyskane wyniki sugerują, że serotonina również może być istotnym czynnikiem regulującym w trakcie odsadzania prosiąt (**B.10, B.23**). W innym układzie doświadczalnym badałam wpływ wyciągu z owocu borówki czarnej (źródło antyoksydantów) na poziom ekspresji alfa kinazy wapniowej II (z ang. *calcium-dependent protein kinase II*; α CaMKII) w neuronach hipokampa u szczurów z cukrzycą. Badania wykazały, że u szczurów cukrzycowych neurony α CaMKII-IR ulegały częstej deformacji (skrócenie wypustek i obrzęk ciał komórkowych) natomiast podanie

wyciągu z owocu borówki czarnej wizualnie wpływało na poprawę ich wyglądu (wypustki nerwowe były dłuższe, a średnica neuronów mniejsza). Wyniki badań sugerują, że antyoksydanty podawane w diecie mogą mieć wpływ na wapnio-zależne procesy neuroprotekcyjne wobec neuronów hipokampa (B.11, B.25).

Ad 4. W ostatnim roku, w ramach krajowej współpracy naukowej podjęłam się także określenia charakterystyki neurochemicznej neuronów zwoju bliższego (jarzmowego, z ang. *jugular ganglion*; JG) nerwu błędnego świni (B.13). Zwoje nerwu błędnego są znanym źródłem neuronów aferentnych unerwiających szeregi narządów wewnętrznych. Praca ta oprócz niewątpliwej wartości poznawczej stanowić może także punkt wyjścia do dalszych badań nad plastycznością neuronów obwodowych (w tym także zwojów nerwu błędnego). Po wykonaniu barwień immunohistochemicznych możliwe było zdefiniowanie w JG kilku subpopulacji neuronalnych, w tym: licznej CGRP-pozytywnej (około 57%); mniej licznych: SP-pozytywnej (około 15%), VACHT-pozytywnej (około 26%), PACAP-pozytywnej (około 15%), galanino-pozytywnej (około 15%), NPY-pozytywnej (około 12%); oraz stosunkowo nielicznych: enkefalino-pozytywnej (około 5%), VIP-pozytywnej (około 6%), NOS-pozytywnej (około 6%). W JG odnotowano także obecność licznych włókien nerwowych IR na CGRP oraz galaninę i pojedyncze włókna nerwowe zawierające SP, PACAP czy enkefaliny.

Lublin 04.10.2017

Anne Ledo-Siemłóg