

Załącznik nr 2a

## AUTOREFERAT

dotyczący osiągnięć w pracy naukowo-badawczej,  
dydaktycznej i organizacyjnej

dr n. wet. Piotr Podlasz

Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2019

**1. Imię i Nazwisko.**

Piotr Podlasz

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

08.03.2000 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

04.11.2004 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Plastyczność neuronów zwoju przyszyjkowego świni po częściowej histerektomii.”

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

od 1 kwietnia 2000 do 4 listopada 2004	Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie	stanowisko: doktorant
od 1 stycznia 2005 do 31 maja 2008	Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie	stanowisko: asystent
od 22 kwietnia 2006 do 23 października 2006	Instytut Biomedycyny/Anatomia, Uniwersytet Helsiński, Finlandia	stanowisko: post-doc
od 1 czerwca 2008 do 30 listopada 2015	Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie	stanowisko: adiunkt
od 01 grudnia 2015 do chwili obecnej	Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie	stanowisko: adiunkt

**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) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

Cykl publikacji powiązanych tematycznie pod zbiorczym tytułem:

„Badanie funkcji galaniny z użyciem danio przegowanego (*Danio rerio*, ang. zebrafish) jako organizmu modelowego.”

**b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),**

**1. Podlasz P, Sallinen V, Chen YC, Kudo H, Fedorowska N, Panula P.** “Galanin gene expression and effects of its knock-down on the development of the nervous system in larval zebrafish.” *Journal of Comparative Neurology*. 2012 Dec 1;520(17):3846-62.

<https://doi.org/10.1002/cne.23131>

**MNiSW =40pkt, IF=3,661 WoS = 15 cytowań**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu zdecydowanej większości eksperymentów, w tym analizie in silico genu galaniny u danio przegowanego, analizie syntenicznej, wyklonowaniu fragmentu genu, stworzeniu sondy molekularnej, zbadaniu ekspresji badanego genu na poziomie mRNA w czasie rozwoju oraz w tkankach dorosłego osobnika, ocenie ekspresji badanego genu na poziomie białka w czasie rozwoju przy użyciu mikroskopu konfokalnego, zahamowaniu translacji badanego genu z użyciem antysensownych oligonukleotydów oraz oceny braku ekspresji tego genu na rozwój układu nerwowego, a także na opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.*

*Mój udział procentowy szacuje na 75%*

**2. Podlasz P, Jakimiuk A, Chmielewska-Krzesinska M, Kasica N, Nowik N, Kaleczyc J** “Galanin regulates blood glucose level in the zebrafish: a morphological and functional study.” *Histochemistry and Cell Biology*. (2016) 145: 105.

<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1376-5>

**MNiSW =35 pkt IF=3,054, WoS = 8 cytowań**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu zdecydowanej większości eksperymentów, w tym przygotowaniu sondy molekularnej do hybrydyzacji in situ, wykonaniu większości barwień immunofluorescencyjnych i ich analizie z użyciem mikroskopu konfokalnego w na różnych etapach rozwoju i u dorosłych osobników, przeprowadzeniu badania wpływu galaniny na poziom glukozy we krwi, a także analizie opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.*

*Mój udział procentowy szacuje na 75%*

**3. Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica-Jarosz N, Czaja K, Wasowicz K.** Neuroanatomical Localization of Galanin in Zebrafish Telencephalon and Anticonvulsant Effect of Galanin Overexpression. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018 Aug 23.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscemneuro.8b00239>

**MNiSW =40 pkt, IF=4,211, WoS = 0 cytowań**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu zdecydowanej większości eksperymentów w tym: wykonaniu barwień immunofluorescencyjnych i analiza ich z użyciem mikroskopu konfokalnego, wykonanie badań behawioralnych w modelu padaczki u osobników nadekspresją galaniny, zbadaniu ekspresji genów z użyciem qPCR, a także opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.*

*Mój udział procentowy szacuje na 80%*

Łączna punktacja trzech oryginalnych prac wchodząca w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi:

-według listy czasopism punktowanych MNiSW = **115 pkt**

-łączny współczynnik oddziaływania, *impact factor* (IF) = **10,926**

- łączna liczba cytowań według bazy Web of Science = **23**

**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

## **Wstęp**

Galanina jest 29-30 aminokwasowym neuropeptydem szeroko rozpowszechnionym zarówno w centralnym jak i obwodowym układzie nerwowym kręgowców (Ch'ng i in., 1985; Skofitsch i Jacobowitz, 1985; Melander i in., 1986). W Neuronach koegzystuje z klasycznymi, drobnocząsteczkowymi neurotransmiterami (Mazarati i in., 2000) i wykazuje silny efekt hamujący na transmisję synaptyczną poprzez hamowanie uwalniania neurotransmiterów (Misane i in., 1998; Zini i in., 1993; Pieribone i in., 1995; Hokfelt i in., 1998). Galanina jest zaangażowana wiele wyższych fizjologicznych funkcji takich jak odczuwanie bólu, funkcje poznawcze, odczuwanie głodu, nastroj i regulacja neurohormonalna. Zbadanie funkcji galaniny w tych procesach może mieć duże znaczenie w terapii wielu stanów chorobowych związanych z tymi procesami (prace przeglądowe: (Bartfai i in., 1993; Holmes i in., 2003; Liu i Hokfelt, 2002; Wrenn i Crawley, 2001). Galanina jest silnie indukowalnym neuropeptydem, wykazującym znaczny wzrost ekspresji w przebiegu procesów patologicznych zachodzących w układzie nerwowym. Znaczący wzrost ekspresji galaniny jest obserwowany po uszkodzeniu nerwu obwodowego (Hokfelt i in., 1987; Villar i in., 1989), w zapaleniu, w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Alzheimera, stwardnieniu rozsianym (Hobson i in., 2010), w czasie rozwoju układu nerwowego (Marti i in., 1987; Gabriel i in., 1989), a także pod wpływem estrogenu (Vrontakis i in., 1989). Wcześniejsze badania sugerują, że podwyższony poziom galaniny może mieć pozytywny wpływ na regenerację uszkodzonego nerwu. Badania z użyciem myszy knock-out oraz z nadekspresją galaniny potwierdzają pozytywny wpływ galaniny na przeżycie, regenerację i odzyskiwanie funkcji uszkodzonego nerwu (Holmes i in., 2005). Galanina jest także istotna dla rozwoju i przeżycia części neuronów w zwojach kręgowych (Holmes i in., 2000) oraz neuronów cholinergicznycj jader podstawnych mózgowia u ssaków (O'Meara i in., 2000). Galanina może zwiększać spożycie pokarmu, masę ciała oraz powodować otyłość (Lang i in., 2007).

Wykazano także obecność galaniny w wielu rodzajach guzów nowotworowych, gdzie może ona mieć wpływ na namnażanie się i apoptozę komórek nowotworowych (Rauch i Kofler, 2010). Dla przykładu obecność galaniny stwierdzono w guzie chromochłonnym, gruczolaku

przysadki mózgowej, raku drobnokomórkowym płuc, raku piersi, czerniaku, raku płaskonabłonkowym, gruczolakoraku okrężnicy, nerwiaku zarodkowym, a także glejaku i oponiaku (Berger i in., 2002; Berger i in., 2003; Rauch i Kofler, 2010). Wykazano również, że galanina ulega ekspresji w keratynocytach, ekrynowych gruczołach potowych i wokół naczyń krwionośnych. Ponadto sugeruje się, że galanina ulega ekspresji w makrofagach skóry właściwej (Bauer i in., 2010). Galanina ma również wpływ na ziarninowanie i angiogenezę (Yamamoto i in., 2011).

Powyższe informacje wskazują, że galanina jest wielofunkcyjnym peptydem. Chociaż od jego odkrycia minęło 35 lat, wiele jego funkcji nie zostało w pełni wyjaśnionych. Uważam, że dotychczas stosowane modele badawcze mają pewne ograniczenia, które uniemożliwiają pełne zrozumienie działania galaniny. Dlatego postanowiłem zbadać funkcję galaniny za pomocą innego, dotychczas nie stosowanego modelu - danio pręgowanego.

Danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. zebrafish) to mała tropikalna ryba słodkowodna, żyjąca w rzekach północnych Indii, północnego Pakistanu, Nepalu i Bhutanu. Ze względu na niewielkie rozmiary i łatwość hodowli, danio pręgowany stał się ulubionym organizmem modelowym do badania rozwoju embrionalnego. Rozwój danio pręgowanego jest bardzo podobny do embriogenezy u wyższych kręgowców, w tym u ludzi, ale w przeciwieństwie do ssaków, danio pręgowany rozwija się poza organizmem samicy. Do tego jajo jest otoczone przezroczystą osłonką, co pozwala na obserwację rozwijającego się zarodka w jego "naturalnym środowisku". Co więcej, same zarodki są przezroczyste w ciągu pierwszych kilku dni ich życia. Pozwala to obserwować tworzenie narządów wewnętrznych "na żywo" wewnątrz żywego organizmu. Rozwój embrionalny danio pręgowanego przebiega bardzo szybko: w ciągu pierwszych 24 godzin po zapłodnieniu powstają wszystkie główne narządy, a w ciągu 3 dni wylęgają się larwy i zaczynają szukać pożywienia. Po 3 - 4 miesiącach danio pręgowany jest dojrzały płciowo i może dawać nowe potomstwo. Jedna samica może złożyć ok. 200-300 jaj tygodniowo. Danio pręgowany oferuje rozsądny kompromis między złożonością fizjologiczną organizmu, a wydajnością pracy badawczej, ma w pełni scharakteryzowany genom i wykazuje znaczną fizjologiczną homologię dla ssaków, w tym ludzi (Barbazuk i in., 2000). Co więcej, posiada wyraźną przewagę w porównaniu z innymi modelami zwierzęcymi. Szybszy rozwój i dłuższa żywotność danio pręgowanego, w porównaniu z myszami, czyni je idealnym wyborem do badania procesów neurodegeneracyjnych. Ponadto gryzonie są drogie w utrzymaniu i trudniejsze do modyfikacji genetycznej. Zarodki danio pręgowanego są również łatwo podatne na manipulacje genetyczne i modyfikację aktywności białek. Można to zrobić

przy użyciu oligonukleotydów antysensownych, mRNA lub tworzenia zwierząt transgenicznych. Świetnie się też nadaje do przeszukiwania bibliotek leków umieszczonych na płytkach mikrotitracyjnych (Eisen i Smith, 2008). Co więcej, wczesne etapy rozwojowe danio pręgowanego są niezmiernie przydatne w badaniach procesów i zaburzeń OUN, także dorosłe ryby z pełnym zakresem funkcji mózgu mają niekiedy znaczną przewagę w analizie złożonych funkcji mózgu kręgowców (Panula i in., 2006), gdyż danio pręgowany wykazuje wiele zachowań wyższego rzędu, w tym pamięć, odruchy warunkowe i zachowania społeczne (Lieschke i Currie, 2007). Wszystkie te zalety sprawiają, że danio pręgowany jest doskonałym organizmem modelowym do badań nad biologią kręgowców, a szczególnie w badaniach genetyki kręgowców i rozwoju zarodkowego. Danio pręgowany jest również wykazującym duży potencjał modelem dla chorób ludzi i zwierząt oraz badań przesiewowych leków (Panula i in., 2006; Bandmann i Burton, 2010; Kokel i in., 2010; Panula i in., 2010; Rihel i in., 2010). Dostępność systemów obrazowania w celu wizualizacji kompletnych systemów neuroprzekazników w całym larwalnym mózgu ryb w czasie, gdy ryba już zachowuje się jako niezależny organizm (Podlasz i in., 2012; Podlasz i in., 2016; Sallinen i in., 2009a; Sallinen i in., 2009b) i dostępne ilościowe metody behawioralne (Podlasz i in., 2018; Sallinen i in., 2009a; Sallinen i in., 2009b; Burgess i in., 2010) czynią danio pręgowanego optymalnym narzędziem badawczym do badania funkcji galaniny w warunkach fizjologicznych i patologicznych u zwierząt i ludzi.

Wykorzystanie unikalnych zalet danio pręgowanego jako organizmu modelowego w badaniach funkcji galaniny daje nadzieję na przełamanie barier, które spotyka się w badaniach z użyciem innych modeli eksperymentalnych. Skutkować to powinno szybkim progresem w badaniach nad mechanizmami leżącymi u podstaw działania galaniny. Opisywany cykl publikacji, moim zdaniem stanowi dobry przykład na skutecznie wykorzystanie tego nowego organizmu modelowego w badaniu funkcji neuropeptydów. Lepsze poznanie roli galaniny, być może pozwoli wykorzystać ten peptyd lub jego analogi w terapii wielu chorób zwierząt i ludzi, w tym choroby Alzheimera, epilepsji, uszkodzeń układu nerwowego, otyłości, cukrzycy i nowotworów.

## **Cel naukowy i zakres badawczy**

Głównym celem mojego osiągnięcia naukowego było zbadanie funkcji neuropeptydu galaniny w czasie procesów fizjologicznych i patologicznych. Szczegółowo, osiągnięcie wyznaczonego celu naukowego obejmowała realizację następujących zadań badawczych:

- 1) Zbadanie, czy danio pręgowany (*Danio rerio*) może stanowić dobry organizm modelowy w badaniach funkcji galaniny, czyli na ile gen galaniny i jego ekspresja jest homologiczna do innych kręgowców, w tym człowieka. Zadanie to polegało na identyfikacji genu galaniny u danio pręgowanego, poznanie jego struktury oraz sekwencji nukleotydowej, porównaniu genu galaniny z genami innych kręgowców, zbadaniu ekspresji genu galaniny u danio pręgowanego na poziomie mRNA oraz białka, w czasie rozwoju osobniczego oraz w tkankach dorosłego osobnika oraz porównaniu jej do innych kręgowców. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2012 (**I.B.1**).
- 2) Zbadanie wpływu zahamowania ekspresji galaniny na rozwój układu nerwowego w czasie rozwoju osobniczego. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2012 (**I.B.1**).
- 3) Zbadanie unerwienia galaninergicznego wysp trzustkowych u danio pręgowanego w czasie rozwoju osobniczego oraz u dorosłego osobnika, a także źródła jego pochodzenia. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2016 (**I.B.2**).
- 4) Zbadanie wpływu galaniny na poziom glukozy we krwi. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2016 (**I.B.2**).
- 5) Zbadanie unerwienia galaninergicznego kresomózgowia u danio pręgowanego w czasie rozwoju osobniczego oraz u dorosłego osobnika. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2018 (**I.B.3**).
- 6) Zbadanie przeciwdrgawkowego efektu galaniny w modelu padaczkowym z użyciem danio pręgowanego jako organizmu modelowego. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Podlasz i in. 2018 (**I.B.3**).

## **Badanie ekspresji genu galaniny u danio pręgowanego**

Pomimo tego, iż wiadomo, że galanina pełni istotną funkcję w układzie nerwowym kręgowców, struktura genu galaniny oraz ekspresja tego neuropeptydu w czasie rozwoju i dorosłego danio pręgowanego były nieznane. Aby dowiedzieć się, czy gen galaniny istnieje u danio pręgowanego, przeanalizowałem bazę danych genomu danio pręgowanego i odkryłem,



że gen galaniny znajduje się na chromosomie 25. Analiza synteniczna genu galaniny wykazała, że położenie tego genu jest bardzo konserwatywne u wszystkich zbadanych kręgowców w tym człowieka i danio pręgowanego. Maje badania wykazały, że gen galaniny u danio pręgowanego jest bardzo podobny do genu u innych zbadanych gatunków. Struktura badanego genu jest identyczna ze strukturą genów galaniny u ssaków: składa się z sześciu egzonów i zawiera peptyd sygnałowy, galaninę i GMAP. Dojrzały peptyd zawiera 29 aminokwasów, a N-końcowy fragment peptydu (aminokwasy 1-13: GWTLNSAGYLLGP) jest identyczny u wszystkich dotychczas zbadanych gatunków, w tym u danio pręgowanego. Ten silny konserwatyzm ewolucyjny może świadczyć o ważnej i zbliżonej roli galaniny u wszystkich kręgowców.

W czasie tych badań okazało się, że u danio pręgowanego występuje dodatkowo dłuższa izoforma cDNA galaniny. Zawiera ona insert o długości 72 nukleotydów w środku sekwencji kodującej peptyd galaniny. To wstawienie nie zmienia ramki odczytu, a dojrzały peptyd ma zachowany N-końcowy konserwatywny fragment o długości 13 aminokwasów, który jest ważny dla interakcji z receptorami galaniny. Sugeruje to, że ta izoforma jest również aktywna biologicznie u danio pręgowanego.

Następnie zbadano ekspresję badanego genu na różnych etapach rozwoju, stosując hybrydyzację *in situ*, technikę RT-PCR i immunocytochemię.

W celu określenia ekspresji genu galaniny w czasie rozwoju osobniczego oraz w narządach dorosłych osobników, całkowity RNA wyizolowano z niezapłodnionych jaj, z zapłodnionych jaj 2 godz. po zapłodnieniu (hpf), 4 hpf, 6 hpf, 8hpf, 10hpf, 12 hpf, 16 hpf, 20 hpf, 22 hpf, 1-5 dni po zapłodnieniu (dpf) oraz z następujących narządów dorosłych osobników: mózg, oko, jelito, serce, wątroba, nerki i skrzela. Następnie dokonano odwrotnej transkrypcji, a uzyskane cDNA posłużyło jako matryca w reakcji PCR. Nasze wyniki wykazały, że ekspresja galaniny jest dość powszechna w narządach dorosłego danio pręgowanego. Wysoka ekspresja w mózgu jest prawdopodobnie związana z funkcją galaniny jako neurotransmitera u danio pręgowanego. mRNA dla galaniny w jelicie może pochodzić z neuronów jelitowego układu nerwowego lub komórek entereoendokrynych. Możliwe jest również, że mRNA galaniny wykryty za pomocą RT-PCR w nerkach i sercu pochodzi z autonomicznych neuronów, które mogą być obecne w tych tkankach. Jednakże wykrycie mRNA galaniny w skrzelach wskazuje, że galanina jest również wytwarzana przez komórki nieneuronalne. Źródłem mRNA dla galaniny u danio pręgowanego mogą być perycyty lub komórki układu immunologicznego, ponieważ u ssaków wykazano obecność mRNA dla galaniny w tych komórkach (Ji i in., 1995; Kofler i in., 2004). Sugeruje to, że galanina u danio pręgowanego ma również funkcje inne niż

przypisywane neurotransmisji. Dalsze wyniki wykazały, że obie izoformy mRNA galaniny ulegają ekspresji na wszystkich etapach rozwoju osobniczego. Wykrycie mRNA galaniny w zarodkach w pierwszych 4 godzinach po zapłodnieniu (hpf) sugeruje, że jest to transkrypt matczynej. Jednak wyraźny wzrost ilości mRNA dla galaniny we wczesnym etapie gastrulacji świadczy o tym, że transkrypt ten jest na późniejszych etapach rozwoju wytwarzany przez zarodek. Może to sugerować, że galanina odgrywa znaczącą rolę podczas wczesnych etapów rozwoju osobniczego. Według danych uzyskanych z hybrydyzacji *in situ*, pierwsze neurony galaninergiczne w mózgu pojawiają się nieco przed 28hpf. Sugeruje to, że widoczny wzrost ekspresji galaniny po 1 dpf jest związany z produkcją galaniny jako neuroprzekaźnika w mózgu. Jednakże ekspresja przed 24hpf dowodzi, że galanina ma inną funkcję podczas rozwoju niż neurotransmisja. Galanina może spełniać istotną przejściową rolę w czasie rozwoju osobniczego lub jej ekspresja jest pozostałością ewolucyjną, a jej funkcja w czasie rozwoju jest nieznacząca (Herlenius i Lagercrantz, 2001).

Do hybrydyzacji *in situ* została wykorzystana sonda molekularna przeciwko mRNA dla galaniny. Aby ją wykonać uzyskany poprzednio fragment cDNA galaniny danio pręgowanego wklonowano do wektora, który posłużył do reakcji transkrypcji *in vitro*. Następnie przeprowadzono procedurę hybrydyzacji *in situ* na zarodkach i larwach danio pręgowanego (6 hpf - 5 dpf).

Z kolei, aby zbadać rozwój układu galaninergicznego w mózgu danio pręgowanego na poziomie białka, wykorzystano technikę immunofluorescencyjną. W tym celu wykorzystano królicze przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko galaninie świnińskiej. Po procedurze immunofluorescencyjnej próbki analizowano za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego Leica DM RXA i systemu mikroskopii konfokalnej Leica TCS SP2 AOBs. Stosy obrazów zostały skompilowane w celu uzyskania obrazów projekcji o maksymalnej intensywności. Dodatkowo każdy skrawek optyczny był analizowany osobno, skrawek po skrawku, w celu wykrycia nawet drobnych szczegółów, a niektóre stopy obrazów były przetwarzane w celu uzyskania trójwymiarowych rekonstrukcji systemu galaninergicznego w mózgu. Nasze wyniki uzyskane techniką hybrydyzacji *in situ* i immunofluorescencyjną wykazały, że neurony galaninergiczne zlokalizowane są głównie w regionach przedwzrokowo-podwzgórzowych, a włókna galaninergiczne unerwiają wiele obszarów mózgu, w tym: kresomózgowie, podwzgórze, śródmózgowie, rdzeń przedłużony i przysadkę mózgową. Szczególnie interesujące jest silne unerwienie przedniej części rdzenia kręgowego, które zanika na późniejszych etapach rozwoju. Źródłem zanikających w czasie rozwoju włókien

galaninergicznych stwierdzonych w opisywanych badaniach są prawdopodobnie dwie małe populacje neuronów w śródmózgowiu i tyłomózgowiu. Neurony w tyłomózgowiu znikają u larw 4dpf i tylko pojedyncze włókna pozostają w tym regionie. Zmniejszenie liczby włókien nerwowych unerwiających rdzeń kręgowy może być związane z procesem tworzenia szlaków mózgowo-rdzeniowych, gdy neurony konkurują podczas rozwoju o czynniki neurotroficzne i tylko nieliczne przeżywają konkurencję. Jednak istnienie przejściowej grupy neuronów podczas rozwoju sugeruje, że mogą one wpływać na rozwój unerwionego narządu. Galanina uwalniana z zakończeń nerwowych może mieć działanie troficzne na neurony lub glej, co sugerują niektóre z badań (Holmes i in., 2000; O'Meara i in., 2000). Nie udało się jednak zidentyfikować określonej populacji komórek rdzenia kręgowego, które ucierpiały pod wpływem braku galaniny w wyniku eksperymentów z zahamowaniem ekspresji galaniny opisywanej w dalszej części pracy.

### **Wpływ braku galaniny na rozwój układu nerwowego danio pręgowanego**

Aby zbadać wpływ braku galaniny na rozwój układu nerwowego, zaprojektowano i przetestowano dwa rodzaje oligonukleotydów antysensownych (morpholino: MO). Jedno z MO zaprojektowane było przeciwko sekwencji 5'-UTR mRNA galaniny danio pręgowanego (MO1). Drugie nacelowane było na miejsce alternatywnego składania między eksonem 3 i intronem 3 (MO2). MO było podawane w formie iniekcji do zarodka w fazie pierwszej komórki. Wykorzystano także standardowe MO kontrolne w celu potwierdzenia specyficzności efektu. W celu sprawdzenia skuteczności MO, mózgi osobników w wieku 4, 5 i 7dpf zostały pobrane oraz wybarwione techniką immunofluorescencyjną „whole mount” z przeciwciałem przeciw galaninie. Po wstrzyknięciu 4 ng MO1 nie wykryto widocznych struktur galanino-immunoreaktywnych w mózgach larw danio pręgowanego do 5 dpf. W mózgach osobników 7 dpf widoczne było bardzo słabe barwienie. Sugeruje to, że MO1 skutecznie hamuje tworzenie galaniny u osobników w pierwszych kilku dniach po zapłodnieniu. Wygląd morfologiczny larw po iniekcji MO1 był nie do odróżnienia od osobników z grup kontrolnych. W przypadku MO2 wykazano zależne od dawki nieprawidłowości rozwoju. MO2 w dawce 2 ng skutecznie hamowało translację galaniny do 2dpf. Jednak nawet ta dawka powodowała u większości osobników wady rozwojowe. Larwy wykluwały się, ale nie napelniały pęcherzy pławnych i nie były w stanie się samodzielnie odżywiać. Większość larw ginęła w wieku 9-10 dpf. Dlatego do dalszych badań użyto tylko MO1.

W celu określenia wpływu braku galaniny na rozwój zwojów kręgowych (DRG), po iniekcji MO, u osobników w wieku 2dpf i 3dpf wyznakowano neurony zwojowe z użyciem przeciwciała monoklonalnego anti-HuC/D techniką immunofluorescencyjną „whole mount”. U osobników z zahamowaną ekspresją galaniny zauważono zmniejszenie liczby DRG w wieku 2dpf. U osobników kontrolnych w tym wieku w DRG częściej obserwowano 2 neurony w pojedynczym zwoju niż u osobników nie posiadających galaniny. Jednak u osobników w wieku 3dpf nie było znaczących różnic między grupami. Sporadycznie u osobników z zahamowaną ekspresją galaniny widoczny był brak pojedynczych zwojów. Jednak było to również sporadycznie widoczne u osobników kontrolnych. Jest możliwe, że zaobserwowany spadek liczby zwojów u ryb 2dpf może wynikać z braku galaniny, która odgrywa rolę troficzną. Nie można jednak wykluczyć, że efekt ten jest spowodowany niespecyficznym opóźnieniem w rozwoju, które jest niezauważalne w późniejszych etapach rozwoju.

Aby zbadać wpływ braku galaniny na rozwój systemów neuroprzekaźników, po iniekcji MO przeciw galaninie, mózgi osobników w wieku 5dpf zostały użyte do barwień immunofluorescencyjnych „whole mount” w celu wyznakowania systemów: dopaminergicznego, histaminergicznego, serotonergicznego, oreksynergicznego. Analiza za pomocą mikroskopii konfokalnej nie wykazała istotnych różnic w w/w układach neurotransmiterowych u osobników bez galaniny w stosunku do grupy kontrolnej.

W celu zbadania ekspresji kluczowych genów związanych z neuroprzekaźnikami i p53 u ryb pozbawionych galaniny, przeprowadzono badania techniką ilościowej RT-PCR. Badania wykonano na larwach w wieku 3dpf (30 osobników na próbkę). Zbadano ekspresję genów *hydroksylazy tyrozyny (th1, th2)*, *acetylotransferazy cholinowej (chat)*, *dekarboksylazy histydyny (hdc)*, *oreksyny (orx)* i *galaniny (galn)*. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach ekspresji badanych transkryptów, z wyjątkiem mRNA galaniny, który wykazywał znaczny wzrost. Za pomocą RT-qPCR przeanalizowano również możliwą aktywację genu *p53* i jej izoformy *delta-113*, która może świadczyć o tzw. „off-target effect”. Nie stwierdzono żadnej znaczącej zmiany, co sugeruje, że MO1 nie powoduje żadnych efektów ubocznych.

Niektóre z ostatnich badań pokazują, że galanina odgrywa rolę troficzną podczas rozwoju. Jednak brak galaniny nie spowodował widocznych defektów morfologicznych obserwowanych u danio pręgowanego w wieku 5dpf. Nie zaobserwowano również widocznych zmian w innych układach neuroprzekaźników w mózgu (TH1, 5-HT, HA, Orx) badanych za pomocą immunohistochemii i RT-qPCR. Sugeruje to, że rola galaniny nie jest

kluczowa dla rozwoju, a organizm jest w stanie zainicjować procesy kompensacyjne, pozwalające radzić sobie z brakiem galaniny podczas rozwoju.

## **Unerwienie galaninerгіczne wysp trzustkowych u danio pręgowanego oraz źródła jego pochodzenia**

Moje poprzednie badania wykazały, że galanina ulega ekspresji głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, jednak uzyskane dane sugerowały, że może także być produkowana przez neurony układu autonomicznego oraz przez komórki nieneuronalne. Poza tym barwienia immunofluorescencyjne „whole mount” z przeciwciałem przeciwko galaninie ujawniły silną immunoreaktywność w kierunku badanego peptydu na terenie trzustki u osobników embrionalnych i larwalnych.

Badania przeprowadzone na ssakach wykazały, że galanina może brać udział w regulacji poziomu glukozy we krwi. W jednym z pierwszych tego typu badań wykazano hamowanie uwalniania insuliny przez galaninę u psów (Dunning i in., 1986). Jednakże funkcja galaniny w endokrynej części trzustki nie jest w pełni wyjaśniona. Źródłem galaniny wpływającej na komórki endokrynej części trzustki mogą być galaninerгіczne włókna nerwowe unerwiające ten narząd. Takie włókna nerwowe były stwierdzane u wielu gatunków w tym u człowieka (McDonald i in., 1992; Shimosegawa i in., 1992), jednak pochodzenie tych włókien jest niejasne.

Jak wspomniano we wstępie, galanina, oprócz klasycznej roli neuroprzekaźnika, ma również inne funkcje. Istnieją pewne dowody na to, że odgrywa ona rolę czynnika troficznego podczas ontogenezy (Hobson i in., 2010), dlatego też galanina uwalniana z włókien nerwowych może mieć istotne znaczenie w czasie rozwoju endokrynej części trzustki. Jednak dostępna literatura nie zawiera informacji o unerwieniu trzustki danio pręgowanego ani o potencjalnym wpływie galaniny na funkcję jej części endokrynej. Dlatego celem niniejszych badań była analiza unerwienia galaninerгіcznego endokrynej części trzustki, w tym źródeł tego unerwienia u danio pręgowanego.

W celu zbadania unerwienia galaninerгіcznego wysp trzustkowych na różnych etapach rozwoju osobniczego danio pręgowanego, przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne na osobnikach embrionalnych, larwalnych bądź młodocianych („whole mount”) oraz dorosłych

(„whole mount” i na skrawkach). W celu identyfikacji komórek  $\beta$  wysp trzustkowych do badań wykorzystano transgeniczny szczep danio pręgowanego Tg(mnx:TagRFP), u którego czerwone białko fluorescencyjne ulega ekspresji w tych komórkach. Próbki były analizowane z użyciem mikroskopu konfokalnego LSM 700 (Zeiss). Wyniki badań wskazują, że u danio pręgowanego wysepki trzustkowe otrzymują bardzo obfite unerwienie galaninerwiczne. Przyczyna tak intensywnego unerwienia u danio pręgowanego nie jest jasna. Jednym z wyjaśnień może być fakt, że galanina odgrywa rolę czynnika troficznego w rozwijającej się endokrynej części trzustki, gdyż ta funkcja galaniny jest już znana (Hobson i in., 2010). Jednakże, prezentowane wyniki są w pewnym stopniu sprzeczne z tą teorią, ponieważ intensywne unerwienie zaobserwowano na każdym z badanych stadiów rozwojowych, a zatem było również obfite u dorosłych zwierząt.

Następnie zbadano potencjalne źródła unerwienia galaninerwicznego wysp trzustkowych. Do tej części badań wykorzystano również mikroskopię konfokalną. Jednakże, oprócz techniki immunofluorescencyjnej „whole mount”, zastosowano także fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* „whole mount”. Pochodzenie galaninerwicznych włókien nerwowych unerwiających wewnątrzwydzielniczą część trzustki jest do tej pory nie jasne. Istnieje powszechny pogląd, iż u ssaków galanina jest zlokalizowana w unerwiających wysepki trzustkowe adrenergicznych nerwach sympatycznych (Ahren, 2000). Źródłem tych włókien może być zwój trzewny, w którym galanina kolokalizuje z hydroksylazą tyrozyny (Ahren i in., 1990). Jednakże, niektóre badania wykazały, że zakończenia nerwów zawierające galaninę w przeważającej mierze nie są adrenergiczne, a mają charakter włókien przywspółczulnych (Verchere i in., 1996). Nasze badania wykazały, że u danio pręgowanego nerwy współczulne są bardzo rzadkie lub nieobecne na terenie wewnątrzwydzielniczej części trzustki, a unerwienie galaninerwiczne wysp trzustkowych zapewniają neurony zlokalizowane w zwojach znajdujących się w pobliżu jelitowej gałęzi nerwu błędnego. Neurony w tych zwojach nie zawierają hydroksylazy tyrozyny, co wskazuje, że nie należą one do współczulnej/adrenergicznej części autonomicznego układu nerwowego. W niniejszych badaniach po raz pierwszy wykazano nie-adrenergiczne, nie-czuciowe zwoje nerwowe u danio pręgowanego, oraz że te zwoje zawierają wiele neuronów galaninerwicznych unerwiających trzustkę. Zwoje te są prawdopodobnie utworzone z neuronów zazwojowych pochodzących z nerwu błędnego i są one ściśle związane z gałęziami jelitowymi tego nerwu. Najprawdopodobniej są to homologi zwojów śród/trzustkowych opisanych u ssaków (Furuzawa i in., 1996; Verchere i in., 1996; Myojin i in., 2000; Baltazar i in., 2001) i innych

ryb (Putti i in., 2000; Yui i Fujita, 1986). Należą one do przywspółczulnej / cholinergicznej części autonomicznego układu nerwowego. Jednak poza unerwieniem z nerwu błędnego, ich neurony otrzymują także unerwienie z układu współczulnego, jelitowego i czuciowego (przeгляд, patrz (Love i in., 2007).

## **Wpływ galaniny na poziom glukozy we krwi**

Porównanie unerwienia galaninergicznego wysp trzustkowych na różnych etapach rozwoju danio pręgowanego wykazało, że jest ono bardzo silne zarówno u larw, osobników młodocianych jak i dorosłych. Sugeruje to, że główną funkcją galaniny nie jest funkcja związana z rozwojem wysp trzustkowych. Silne unerwienie komórek  $\beta$  oraz  $\delta$  wykazane w poprzedniej części badań sugeruje, że galanina może regulować wydzielanie hormonów z tych komórek, przez co może mieć wpływ na poziom glukozy we krwi. Dlatego też postanowiono zbadać wpływ galaniny na poziom glukozy we krwi danio pręgowanego.

Do tego eksperymentu wykorzystano dorosłe ryby (12-miesięczne, samce i samice). Przedtem ryby pościły przez 72 godziny. Następnie rybom podawano dootrzewnowo glukozę i 2 różnych agonistów receptorów galaninowych: NAX 5055, analog galaniny i agonista receptorów galaninowych (uprzejmie подарowany przez Dr Steve'a White'a i Grzegorza Bulaję z University of Utah (White i in., 2009)) i galnon, niepeptydowy, nieselektywny agonista receptorów galaninowych (Bachem). Po 2,5h od iniekcji ryby poddano anestezji, pobrano krew z tętnicy ogonowej i zbadano poziom glukozy przy użyciu glukometru.

Dootrzewnowa iniekcja analogu galaniny NAX 5055 spowodowała wzrost poziomu glukozy we krwi u dorosłego danio pręgowanego. Zaskakująco, wstrzyknięcie galnonu, niepeptydowego agonisty receptorów galaninowych, nie miało istotnego wpływu na poziom glukozy we krwi. Brak wyraźnego wzrostu poziomu glukozy we krwi po podaniu galnonu jest zgodny z wynikami innych badaczy, w których galnon nawet stymulował wydzielanie insuliny w izolowanych wysepkach trzustkowych szczurów (Quynh i in., 2005). Wykazano, że galnon ma umiarkowane powinowactwo do receptorów galaninowych (Saar i in., 2002). Ma wiele miejsc oddziaływania w obrębie kaskady sygnałowej receptorów sprzężonych z białkami G (Florén i in., 2005), a w jego działaniu pośredniczą elementy niezwiązane z receptorami galaninowymi, co może wyjaśniać różnice w wpływie na poziom glukozy we krwi pomiędzy galnon i NAX 5055.

Mechanizm działania galaniny na poziom glukozy we krwi nie jest w pełni wyjaśniony. Istnieją jednak silne dowody na to, że galanina hamuje uwalnianie insuliny z komórek  $\beta$  trzustki (Flynn i White, 2015; Lindskog i in., 1995). Galanina może działać bezpośrednio na komórki  $\beta$  i hamować uwalnianie insuliny. Nasze badania ujawniły bardzo gęstą sieć włókien nerwowych zawierających galaninę unerwiających komórki  $\beta$  u danio pręgowanego. Możliwym jest także, że galanina wpływa pośrednio na poziom glukozy we krwi, a głównym celem włókien galaninergicznych może być populacja komórek  $\delta$ , ponieważ włókna te leżały w bliskim sąsiedztwie komórek produkujących somatostatynę. Ta teza ma poparcie w innych badaniach, gdzie wykazano, że galanina wywiera hamujący wpływ na uwalnianie somatostatyny z trzustki (Dunning i in., 1986). Wiele badań wskazuje, że somatostatyna jest zaangażowana w regulację uwalniania insuliny i glukagonu z wysp trzustkowych (Hauge-Evans i in., 2009). Możliwe jest również, że galanina wpływa na poziom glukozy we krwi za pośrednictwem innych szlaków, ponieważ niektóre badania wskazują, że peptyd stymuluje wydzielanie glukagonu (Boyle i in., 1994; Dunning i in., 1986; Lindskog i Ahren, 1987). Jednakże dokładny mechanizm działania galaniny na wytwarzanie i/lub wydzielanie hormonów trzustkowych powinien zostać wyjaśniony w dalszych badaniach.

## **Neuroanatomiczna lokalizacja galaniny w kresomózgowiu danio pręgowanego**

Badania na ssakach wykazały, że galanina w mózgu może działać jako neuroprzekaźnik hamujący. Stąd pojawiła się idea, aby sprawdzić, czy galanina bierze udział w regulacji drgawek w epilepsji i czy można by było ją bądź jej analogi stosować w terapii tego schorzenia.

U ssaków główną strukturą zaangażowaną w rozprzestrzenianie się aktywności padaczkowej jest hipokamp (Heinemann i in., 1992). U ryb nie można odróżnić morfologicznie hipokampa. Jednakże doświadczenia z ablacją połączone z eksperymentami behawioralnymi sugerują, że jądro boczne płaszczki, który jest częścią kresomózgowia, wykazuje podobieństwo w funkcji do hipokampa ssaków (Rodriguez i in., 2002a; Rodriguez i in., 2002b; Broglio i in., 2005; Broglio i in., 2010; Duran i in., 2010; Cheng i in., 2014; Ganz i in., 2014). Dane uzyskane poprzednio wykazały (Podlasz i in. 2012, **I.B.1**), że u danio pręgowanego w pierwszych etapach rozwoju włókna galaninergiczne unerwiają kresomózgowie, jednak struktura tego unerwienia u osobników dorosłych nie była znana. Nie



było także wiadome czy włókna te unerwiają region, który uważany jest u ryb za analog hipokampa.

Neuroanatomiczną organizację układu galaninerpicznego w kresomózgowiu zbadano przy użyciu barwień immunohistochemicznych "whole mount" u danio pręgowanego w wieku 5, 7 dni po zapłodnieniu (dpf) oraz u 3-miesięcznej (dorosłej) ryby. Próbkę badano za pomocą konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego LSM 700. Hipokamp ssaków jest intensywnie unerwiony przez włókna galaninerpiczne (Lerner i in., 2010), jednakże uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że regiony mózgu uważane za analogi hipokampa u danio pręgowanego zawierają jedynie nieliczne włókna galanio-immunoreaktywne. Sugeruje to, że u ryb ta niewielka liczba galaninerpicznych włókien nerwowych jest wystarczająca do spełnienia swej funkcji fizjologicznej. Jednakże, możliwe jest też, że jądro boczne płaszcza kresomózgowia może nie odgrywać znaczącej roli w generowaniu napadów padaczkowych. U ssaków hipokamp otrzymuje unerwienie galaninerpiczne z dwóch głównych źródeł: katecholaminergiczne z miejsca sinawego (Hokfelt i in., 1998; Xu i in., 1998), oraz cholinergiczne z jądra przyśrodkowego przegrody (Melander i in., 1985; Lamour i in., 1988; Consolo i in., 1994). Moje poprzednie badania (Podlasz i in., 2012; **I.B.1**) wykazały, że miejsce sinawe nie posiada neuronów galaninerpicznych u danio pręgowanego, ale istnieje wiele neuronów galaninerpicznych zlokalizowanych w polu przedwzrokowym, który jest anatomicznie częścią dobrzuszego kresomózgowia (Podlasz i in., 2012). Uważa się, że dobrzuszne jądro dobrzuszego kresomózgowia danio pręgowanego jest analogiem jąder przegrody ssaków (Wullimann i Rink, 2002; Mueller i Wullimann, 2009). Najprawdopodobniej neurony galaninerpiczne zlokalizowane w polu przedwzrokowym podwzgórza są źródłem nielicznych włókien unerwiających jądro boczne płaszcza opisanych w omawianych wynikach u danio pręgowanego.

## **Przeciwdrgawkowe działanie galaniny**

Fizjologiczne właściwości galaniny sugerują, że peptyd ten może brać udział w regulacji napadów padaczkowych. W celu zbadania przeciwdrgawkowych właściwości galaniny, wykorzystano 5dpf larwy danio pręgowanego w modelu indukcji drgawek pentylenotetrazolem (PTZ).

Ponieważ podawanie galaniny do mózgu larw danio pręgowanego jest problematyczne, zastosowano transgeniczną linię danio pręgowanego Tg(hsp70l: galn) z genetycznie

indukowaną nadekspresją galaniny. W linii tej ekspresja galaniny jest pod kontrolą promotora genu białka szoku cieplnego hsp70l (Woods i in., 2014). Umożliwia to indukcję produkcji galaniny poprzez zastosowanie procedury szoku cieplnego.

Test behawioralny był przeprowadzony zgodnie z Cario (Cario i in., 2011). Do eksperymentów użyto krzyżówki szczepu dzikiego (Tu) oraz transgenicznej linii Tg(hsp70l:galn) danio pręgowanego w wieku 5dpf oraz Tu jako kontroli. Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty. W pierwszym eksperymencie obie grupy, zarówno osobniki kontrolne, jak i eksperymentalne zostały poddane procedurze szoku cieplnego. Szok cieplny uruchomił konstrukt genetyczny hsp70l:galn, co spowodowało zwiększoną produkcję galaniny. W drugim doświadczeniu wykorzystano te same grupy larw danio pręgowanego, jednak bez procedury szoku cieplnego. W celu wywołania drgawek zastosowano 10 mM PTZ. Analizę funkcji motorycznych przeprowadzono z użyciem oprogramowania Matlab i skryptów udostępnionych przez profesora Edwarda A. Burtona, z University of Pittsburgh School of Medicine, USA. Analizowano główne parametry ruchu w tym, średnią prędkość poruszania się larw, prędkość ruchu, % trwania ruchu, czas trwania odpoczynku i czas trwania aktywności. Analiza ta wykazała, że nadekspresja galaniny silnie zmienia wartości większości parametrów lokomotorycznych zarówno w grupach eksponowanych na PTZ, jak i kontrolnych. U osobników z nadekspresją galaniny % trwania ruchu był znacznie zmniejszony, a czas odpoczynku był znacznie wydłużony. Biorąc pod uwagę te parametry, można wywnioskować, że wysoki poziom galaniny sprawia, że czas, w którym larwa się nie porusza jest znacznie dłuższy w porównaniu z rybą kontrolną o normalnym poziomie galaniny. Wpływa to znacząco na średnią prędkość, a tym samym na odległość pokonaną przez larwy. Nadekspresja galaniny nie zmieniała znacząco średniego czasu trwania ciągłego ruchu, jednak tendencja spadkowa była widoczna w grupach o wyższym poziomie ekspresji galaniny po szoku cieplnym. Prędkość podczas ruchu była również zmniejszona u larw z nadekspresją galaniny, ale tylko w eksperymencie, w którym osobniki poddano procedurze szoku cieplnego. Dane te sugerują, że galanina zmniejsza częstość epizodów zachowań typu padaczkowego i ich intensywność, ale bez znaczącego wpływu na ich czas trwania. Z drugiej strony, uzyskane wyniki wykazały, że galanina również silnie wpłynęła na parametry lokomotoryczne u osobników nie eksponowanych na PTZ, co sugeruje, że oprócz działania przeciwpadaczkowego, galanina ma również działanie uspokajające. Działanie uspokajające galaniny opisano wcześniej u innych gatunków, w tym u szczura (Przewlocka i in., 1995) i królika (Maurelli i in., 1993). Działanie uspokajające jest jednym z niekorzystnych efektów

leków przeciwpadaczkowych. Jednak niektóre leki przeciwpadaczkowe o działaniu uspokajającym, wliczając to benzodiazepiny, są szeroko stosowane w leczeniu padaczki (Ochoa i Kilgo, 2016).

Oprócz badań behawioralnych wykorzystano także ilościowy RT-PCR w celu określenia poziomu ekspresji galaniny i zbadania, czy jej poziom koreluje z poziomem mRNA dla genu *c-fos* (marker aktywności neuronów) w modelu indukowanej padaczki przez PTZ. Zgodnie z oczekiwaniami po szoku cieplnym poziom mRNA galaniny w linii transgenicznej Tg(hsp70l: galn) dramatycznie wzrósł (ponad 300-krotnie). Konstrukcja genetyczna hsp70l: galn ulega ekspresji po indukcji przez szok termiczny, w każdym typie komórki, w tym w neuronach, u ryb z tej linii transgenicznej. Powoduje to, że poziom galaniny w mózgu jest bardzo wysoki, znacznie wyższy niż poziom fizjologiczny. Jednak stosowanie terapeutyczne galaniny w tak wysokich dawkach może być problematyczne i może powodować silne efekty uboczne. Dlatego postanowiliśmy zbadać, czy niższy poziom ekspresji galaniny również wywrze znaczący wpływ. Okazało się, że transgeniczna linia Tg(hsp70l: galn) wykazała wielokrotnie wyższy poziom mRNA galaniny, nawet bez szoku termicznego. Konstrukcja genetyczna hsp70l: galn wykorzystuje promotor do hsp70l. To białko jest silnie indukowalne i ulega ekspresji na niższym poziomie również bez szoku cieplnego podczas fizjologicznych procesów zachodzących w każdej komórce (Mashaghi i in., 2016). Dlatego też czynniki transkrypcyjne stymulujące ekspresję hsp70 będą również powodować ekspresję galaniny w linii Tg (hsp70l: galn).

Gen *c-fos* jest protoonkogenem, który bardzo szybko po pobudzeniu neuronalnym ulega aktywacji w neuronach. Dlatego poziom ekspresji *c-fos* uznano za doskonały marker aktywności neuronów (Baxendale i in., 2012). Wykazano, że *c-fos* jest czułym markerem używanym do badania właściwości przeciwdrgawkowych szeregu związków (Baxendale i in., 2012). Omawiane wyniki pokazują, że nadekspresja galaniny znacząco hamuje wzrost ekspresji *c-fos* po wywołaniu drgawek przez PTZ w porównaniu do grupy kontrolnej. Prawdopodobnie zmniejszenie ekspresji genu *c-fos* jest wynikiem zahamowania napadów padaczkowych przez galaninę. Poprzednie badania wykazały, że PTZ wywołuje drgawki poprzez oddziaływanie na pobudzające receptory glutaminergiczne (Schroder i in., 1993; Schroeder i in., 1998a; Schroeder i in., 1998b). Galanina hamuje transmisję glutaminergiczną drogą presynaptyczną (Zini i in., 1993; Mazarati i in., 2000; Kokaia i in., 2001; Walls i in., 2016). Uzyskane w omawianej pracy wyniki sugerują, że zahamowanie ekspresji *c-fos* w mózgu przez galaninę, a co za tym idzie jej przeciwdrgawkowe działanie, jest wywoływane poprzez blokowanie neurotransmisji pobudzającej.

## Podsumowanie i wnioski

Badania zaprezentowane w niniejszym cyklu publikacji wykazały, że:

1. Gen galaniny jest wysoce konserwatywny i bardzo podobny u danio pręgowanego i innych zbadanych dotychczas gatunków, w tym człowieka.
2. Ekspresja tego genu powoduje powstanie aktywnego peptydu podobnego do ssaczego i rozpoczyna się wcześniej u danio pręgowanego.
3. Dystrybucja mRNA dla galaniny w tkankach danio pręgowanego, podobnie jak u ssaków, jest powszechna i obejmuje nie tylko komórki nerwowe, ale i komórki nieneuronalne.
4. Włókna nerwowe zawierające ten neuropeptyd podobnie jak u ssaków, unerwiają wiele regionów OUN. Stwierdzano także obecność u zarodka włókien galaninergetycznych unerwiających przednią część rdzenia kręgowego, które zanikają na dalszym etapie rozwoju.
5. Pozbawienie zarodka galaniny nie wpływa znacząco na rozwój osobniczy oraz rozwój układu nerwowego.
6. Wykazano po raz pierwszy istnienie nie-adrenergicznych, nie-czuciowych zwojów nerwowych u danio pręgowanego. Zwoje te zapewniają obfite unerwienie galaninergetycznej endokrynej części trzustki i innych narządów wewnętrznych.
7. Podanie analogu galaniny NAX5055 powoduje wzrost poziomu glukozy we krwi u danio pręgowanego.
8. Jądro boczne płaszcza kresomózgowia u danio pręgowanego nie jest silnie unerwione przez włókna galaninergetyczne, w przeciwieństwie do jego odpowiednika u ssaków: hipokampa.
9. Nadekspresja galaniny wywiera silny wpływ na funkcję lokomotoryczną. W modelu padaczki indukowanej przez PTZ nadekspresja galaniny powodowała silne działanie przeciwdrgawkowe.
10. Galanina posiada także silny efekt sedatywny.

Wszystkie powyższe wyniki wskazują na to, że ze względu na istotną homologię w budowie genu, peptydu, dystrybucji oraz funkcji galaniny, danio pręgowany jest użytecznym modelem do badania roli galaniny w organizmie zwierząt i ludzi. Dzięki swoim unikalnym cechom, jego

dalsze użycie może skutkować poznaniem wielu nieznanych funkcji tego neuropeptydu, a także przełomem w zastosowaniu analogów galaniny w terapii wielu schorzeń zwierząt i ludzi.

## Odniesienia do literatury

Ahren B. 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43: 393-410.

Ahren B, Bottcher G, Kowalyk S, Dunning BE, Sundler F, Taborsky GJ, Jr. 1990. Galanin is co-localized with noradrenaline and neuropeptide Y in dog pancreas and celiac ganglion. *Cell Tissue Res.* 261: 49-58.

Baltazar ET, Kitamura N, Sasaki M, Cottrell DF, Boloron HM, Yamada J. 2001. Galanin-like immunoreactive neural elements in domestic ruminant pancreas. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 841-848.

Bandmann O, Burton EA. 2010. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* 40: 58-65.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. 2000. The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Research* 10: 1351-1358.

Bartfai T, Hokfelt T, Langel U. 1993. Galanin--a neuroendocrine peptide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 7: 229-274.

Bauer JW, Lang R, Jakab M, Kofler B. 2010. Galanin family of peptides in skin function. *EXS* 102: 51-59.

Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL, Harrison MR, Fox J, Parkin CA, Ingham PW, Cunliffe VT. 2012. Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5: 773-784.

Berger A, Santic R, Almer D, Hauser-Kronberger C, Huemer M, Humpel C, Stockhammer G, Sperl W, Kofler B. 2003. Galanin and galanin receptors in human gliomas. *Acta Neuropathol.* 105: 555-560.

Berger A, Tuechler C, Almer D, Kogner P, Ratschek M, Kerbl R, Iismaa TP, Jones N, Sperl W, Kofler B. 2002. Elevated expression of galanin receptors in childhood neuroblastic tumors. *Neuroendocrinology* 75: 130-138.

Boyle MR, Verchere CB, McKnight G, Mathews S, Walker K, Taborsky GJ, Jr. 1994. Canine galanin: sequence, expression and pancreatic effects. *Regul. Pept.* 50: 1-11.

Broglio C, Rodriguez F, Gomez A, Arias JL, Salas C. 2010. Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behav. Brain Res.* 210: 191-201.

- Broglio C, Gomez A, Duran E, Ocana FM, Jimenez-Moya F, Rodriguez F, Salas C. 2005. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res. Bull.* 66: 277-281.
- Burgess HA, Schoch H, Granato M. 2010. Distinct Retinal Pathways Drive Spatial Orientation Behaviors in Zebrafish Navigation. *Current Biology* 20: 381-386.
- Cario CL, Farrell TC, Milanese C, Burton EA. 2011. Automated measurement of zebrafish larval movement. *J. Physiol. (Lond. )* 589: 3703-3708.
- Cheng RK, Jesuthasan SJ, Penney TB. 2014. Zebrafish forebrain and temporal conditioning. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20120462.
- Ch'ng JL, Christofides ND, Anand P, Gibson SJ, Allen YS, Su HC, Tatemoto K, Morrison JF, Polak JM, Bloom SR. 1985. Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the responses of galanin-containing neuronal pathways to injury. *Neuroscience* 16: 343-354.
- Consolo S, Baldi G, Russi G, Civenni G, Bartfai T, Vezzani A. 1994. Impulse flow dependency of galanin release in vivo in the rat ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 8047-8051.
- Dunning BE, Ahren B, Veith RC, Bottcher G, Sundler F, Taborsky GJ, Jr. 1986. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am. J. Physiol.* 251: E127-33.
- Duran E, Ocana FM, Broglio C, Rodriguez F, Salas C. 2010. Lateral but not medial telencephalic pallium ablation impairs the use of goldfish spatial allocentric strategies in a "hole-board" task. *Behav. Brain Res.* 214: 480-487.
- Eisen JS, Smith JC. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135: 1735-1743.
- Florén A, Sollenberg U, Lundström L, Zorko M, Stojan J, Budihna M, Wheatley M, Martin NP, Kilk K, Mazarati A, Bartfai T, Lindgren M, Langel Ü. 2005. Multiple interaction sites of galanin trigger its biological effects. *Neuropeptides* 39: 547-558.
- Flynn SP, White HS. 2015. Regulation of glucose and insulin release following acute and repeated treatment with the synthetic galanin analog NAX-5055. *Neuropeptides* .
- Furuzawa Y, Ohmori Y, Watanabe T. 1996. Immunohistochemical studies of neural elements in pancreatic islets of the cat. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 641-646.
- Gabriel SM, Kaplan LM, Martin JB, Koenig JI. 1989. Tissue-specific sex differences in galanin-like immunoreactivity and galanin mRNA during development in the rat. *Peptides* 10: 369-374.
- Ganz J, Kroehne V, Freudenreich D, Machate A, Geffarth M, Braasch I, Kaslin J, Brand M. 2014. Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Res* 3: 308.

Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. 2009. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58: 403-411.

Heinemann U, Beck H, Dreier JP, Ficker E, Stabel J, Zhang CL. 1992. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res. Suppl.* 7: 273-280.

Herlenius E, Lagercrantz H. 2001. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum. Dev.* 65: 21-37.

Hobson SA, Bacon A, Elliot-Hunt CR, Holmes FE, Kerr NC, Pope R, Vanderplank P, Wynick D. 2010. Galanin acts as a trophic factor to the central and peripheral nervous systems. *EXS* 102: 25-38.

Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar M, Melander T. 1987. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.* 83: 217-220.

Hokfelt T, Xu ZQD, Shi TJ, Holmberg K, Zhang X. 1998. Galanin in ascending systems - Focus on coexistence with 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Ann. NY Acad. Sci.* 863: 252-263.

Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T, Griebel G. 2003. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 580-588.

Holmes FE, Mahoney S, Wynick D. 2005. Use of genetically engineered transgenic mice to investigate the role of galanin in the peripheral nervous system after injury. *Neuropeptides* 39: 191-199.

Holmes FE, Mahoney S, King VR, Bacon A, Kerr NC, Pachnis V, Curtis R, Priestley JV, Wynick D. 2000. Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 11563-11568.

Ji R, Zhang X, Zhang Q, Dagerlind Å, Nilsson S, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T. 1995. Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation. *Neuroscience* 68: 563-576.

Kofler B, Berger A, Santic R, Moritz K, Almer D, Tuechler C, Lang R, Emberger M, Klausegger A, Sperl W, Bauer JW. 2004. Expression of neuropeptide galanin and galanin receptors in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 122: 1050-1053.

Kokaia M, Holmberg K, Nanobashvili A, Xu ZD, Kokaia Z, Lendahl U, Hilke S, Theodorsson E, Kahl U, Bartfai T, Lindvall O, Hökfelt T. 2001. Suppressed kindling epileptogenesis in mice with ectopic overexpression of galanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 14006-14011.

Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, Cheung CY, Mateus R, Healey D, Kim S, Werdich AA, Haggarty SJ, Macrae CA, Shoichet B, Peterson RT. 2010. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat. Chem. Biol.* 6: 231-237.

- Lamour Y, Senut MC, Dutar P, Bassant MH. 1988. Neuropeptides and septo-hippocampal neurons: electrophysiological effects and distributions of immunoreactivity. *Peptides* 9: 1351-1359.
- Lang R, Gundlach AL, Kofler B. 2007. The galanin peptide family: Receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 115: 177-207.
- Lerner JT, Sankar R, Mazarati AM. 2010. Galanin and epilepsy. *EXS* 102: 183-194.
- Lieschke GJ, Currie PD. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8: 353-367.
- Lindskog S, Ahren B. 1987. Galanin: effects on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in the mouse. *Acta Physiol. Scand.* 129: 305-309.
- Lindskog S, Gregersen S, Hermansen K, Ahren B. 1995. Effects of galanin on proinsulin mRNA and insulin biosynthesis in normal islets. *Regul. Pept.* 58: 135-139.
- Liu HX, Hokfelt T. 2002. The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 468-474.
- Love JA, Yi E, Smith TG. 2007. Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. *Auton. Neurosci.* 133: 19-34.
- Marti E, Gibson SJ, Polak JM, Facer P, Springall DR, Van Aswegen G, Aitchison M, Koltzenburg M. 1987. Ontogeny of peptide- and amine-containing neurones in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin. *J. Comp. Neurol.* 266: 332-359.
- Mashaghi A, Bezrukavnikov S, Minde DP, Wentink AS, Kityk R, Zachmann-Brand B, Mayer MP, Kramer G, Bukau B, Tans SJ. 2016. Alternative modes of client binding enable functional plasticity of Hsp70. *Nature* 539: 448-451.
- Maurelli M, Marchioni E, Tartara A. 1993. EEG and autonomic effects of centrally administered galanin in the rabbit. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 69: 485-491.
- Mazarati AM, Hohmann JG, Bacon A, Liu H, Sankar R, Steiner RA, Wynick D, Wasterlain CG. 2000. Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. *J. Neurosci.* 20: 6276-6281.
- McDonald TJ, Brooks BD, Rokaeus A, Tinner B, Staines WA. 1992. Pancreatic galanin: molecular forms and anatomical locations. *Pancreas* 7: 624-635.
- Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A. 1986. Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 248: 475-517.
- Melander T, Staines WA, Hokfelt T, Rokaeus A, Eckenstein F, Salvaterra PM, Wainer BH. 1985. Galanin-like immunoreactivity in cholinergic neurons of the septum-basal forebrain complex projecting to the hippocampus of the rat. *Brain Res.* 360: 130-138.



Misane I, Razani H, Wang FH, Jansson A, Fuxe K, Ogren SO. 1998. Intraventricular galanin modulates a 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated behavioural response in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1230-1240.

Mueller T, Wullimann MF. 2009. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain Behav. Evol.* 74: 30-42.

Myojin T, Kitamura N, Hondo E, Baltazar ET, Pearson GT, Yamada J. 2000. Immunohistochemical localization of neuropeptides in bovine pancreas. *Anat. Histol. Embryol.* 29: 167-172.

Ochoa JG, Kilgo WA. 2016. The Role of Benzodiazepines in the Treatment of Epilepsy. *Current Treatment Options in Neurology* 18: 18.

O'Meara G, Coumis U, Ma SY, Kehr J, Mahoney S, Bacon A, Allen SJ, Holmes F, Kahl U, Wang FH, Kearns IR, Ove-Ogren S, Dawbarn D, Mufson EJ, Davies C, Dawson G, Wynick D. 2000. Galanin regulates the postnatal survival of a subset of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 11569-11574.

Panula P, Chen Y-, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V. 2010. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* 40: 46-57.

Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, Moshnyakov M, Podlasz P. 2006. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 3: 235-247.

Pieribone VA, Xu ZQ, Zhang X, Grillner S, Bartfai T, Hokfelt T. 1995. Galanin Induces a Hyperpolarization of Norepinephrine-Containing Locus-Coeruleus Neurons in the Brain-Stem Slice. *Neuroscience* 64: 861-874.

Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica-Jarosz N, Czaja K, Wasowicz K. 2018. Neuroanatomical Localization of Galanin in Zebrafish Telencephalon and Anticonvulsant Effect of Galanin Overexpression. *ACS Chem. Neurosci.*

Podlasz P, Jakimiuk A, Chmielewska-Krzesinska M, Kasica N, Nowik N, Kaleczyc J. 2016. Galanin regulates blood glucose level in the zebrafish: a morphological and functional study. *Histochem. Cell Biol.* 145: 105-117.

Podlasz P, Sallinen V, Chen Y-, Kudo H, Fedorowska N, Panula P. 2012. Galanin gene expression and effects of its knock-down on the development of the nervous system in larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 520: 3846-3862.

Przewlocka B, Machelska H, Rekowski P, Kupryszewski G, Przewlocki R. 1995. Intracerebroventricular galanin and N-terminal galanin fragment enhance the morphine-induced analgesia in the rat. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 102: 229-235.

Putti R, Maglio M, Odierna G, 2nd. 2000. An immunocytochemical study of intrapancreatic ganglia, nerve fibres and neuroglandular junctions in Brockmann bodies of the tompot blenny (*Blennius gattoruggine*), a marine teleost. *Histochem. J.* 32: 607-616.

Quynh NT, Islam MS, Floren A, Bartfai T, Langel U, Ostenson CG. 2005. Effects of galnon, a non-peptide galanin-receptor agonist, on insulin release from rat pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 213-220.

Rauch I, Kofler B. 2010. The galanin system in cancer. *EXS* 102: 223-241.

Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, Haggarty SJ, Kokel D, Rubin LL, Peterson RT, Schier AF. 2010. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* 327: 348-351.

Rodriguez F, Lopez JC, Vargas JP, Gomez Y, Broglio C, Salas C. 2002a. Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *J. Neurosci.* 22: 2894-2903.

Rodriguez F, Lopez JC, Vargas JP, Broglio C, Gomez Y, Salas C. 2002b. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res. Bull.* 57: 499-503.

Saar K, Mazarati AM, Mahlapuu R, Hallnemo G, Soomets U, Kilk K, Hellberg S, Pooga M, Tolf B, Shi TS, Hökfelt T, Wasterlain C, Bartfai T, Langel Ü. 2002. Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 7136-7141.

Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenila I, Khrustalyov D, Kaslin J, Panula P. 2009a. MPTP and MPP<sup>+</sup> target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J. Neurochem.* 108: 719-731.

Sallinen V, Sundvik M, Reenila I, Peitsaro N, Khrustalyov D, Anichtchik O, Toleikyte G, Kaslin J, Panula P. 2009b. Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J. Neurochem.* 109: 403-415.

Schroder H, Becker A, Lossner B. 1993. Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylenetetrazole-kindled rats. *J. Neurochem.* 60: 1007-1011.

Schroeder H, Becker A, Hoell V. 1998a. Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazole-kindled rats. *Exp. Brain Res.* 120: 527-530.

Schroeder H, Becker A, Grecksch G, Schroeder U, Hoell V. 1998b. The effect of pentylenetetrazol kindling on synaptic mechanisms of interacting glutamatergic and opioid system in the hippocampus of rats. *Brain Res.* 811: 40-46.

Shimosegawa T, Moriizumi S, Koizumi M, Kashimura J, Yanaihara N, Toyota T. 1992. Immunohistochemical demonstration of galaninlike immunoreactive nerves in the human pancreas. *Gastroenterology* 102: 263-271.

Skofitsch G, Jacobowitz DM. 1985. Galanin-like immunoreactivity in capsaicin sensitive sensory neurons and ganglia. *Brain Res. Bull.* 15: 191-195.

- Verchere CB, Kowalyk S, Koerker DJ, Baskin DG, Taborsky GJ, Jr. 1996. Evidence that galanin is a parasympathetic, rather than a sympathetic, neurotransmitter in the baboon pancreas. *Regul. Pept.* 67: 93-101.
- Villar MJ, Cortes R, Theodorsson E, Wiesenfeld-Hallin Z, Schalling M, Fahrenkrug J, Emson PC, Hokfelt T. 1989. Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience* 33: 587-604.
- Vrontakis ME, Yamamoto T, Schroedter IC, Nagy JI, Friesen HG. 1989. Estrogen induction of galanin synthesis in the rat anterior pituitary gland demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 100: 59-64.
- Walls AB, Flynn SP, West PJ, Muller MS, Bak LK, Bulaj G, Schousboe A, White HS. 2016. The anticonvulsant action of the galanin receptor agonist NAX-5055 involves modulation of both excitatory- and inhibitory neurotransmission. *Epilepsy Res.* 121: 55-63.
- White HS, Scholl EA, Klein BD, Flynn SP, Pruess TH, Green BR, Zhang L, Bulaj G. 2009. Developing novel antiepileptic drugs: characterization of NAX 5055, a systemically-active galanin analog, in epilepsy models. *Neurotherapeutics* 6: 372-380.
- Woods IG, Schoppik D, Shi VJ, Zimmerman S, Coleman HA, Greenwood J, Soucy ER, Schier AF. 2014. Neuropeptidergic signaling partitions arousal behaviors in zebrafish. *J. Neurosci.* 34: 3142-3160.
- Wrenn CC, Crawley JN. 2001. Pharmacological evidence supporting a role for galanin in cognition and affect. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25: 283-299.
- Wullimann MF, Rink E. 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res. Bull.* 57: 363-370.
- Xu ZQ, Shi TJ, Hokfelt T. 1998. Galanin/GMAP- and NPY-like immunoreactivities in locus coeruleus and noradrenergic nerve terminals in the hippocampal formation and cortex with notes on the galanin-R1 and -R2 receptors. *J. Comp. Neurol.* 392: 227-251.
- Yamamoto H, Arai T, Ben S, Iguchi K, Hoshino M. 2011. Expression of galanin and galanin receptor mRNA in skin during the formation of granulation tissue. *Endocrine* 40: 400-407.
- Yui R, Fujita T. 1986. Immunocytochemical studies on the pancreatic islets of the ratfish *Chimaera monstrosa*. *Arch. Histol. Jpn.* 49: 369-377.
- Zini S, Roisin MP, Langel U, Bartfai T, Benari Y. 1993. Galanin Reduces Release of Endogenous Excitatory Amino-Acids in the Rat Hippocampus. *Eur. J. Pharmacol. -Molec. Pharmacol. Sect.* 245: 1-7.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych z informacją o odbytych stażach krajowych lub zagranicznych ośrodkach naukowych lub akademickich.**

Swoją działalność naukową rozpocząłem w kwietniu 2000 roku w ramach studiów doktoranckich w Katedrze Anatomii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie pod kierownictwem Prof. Mirosława Łakomego. Moim opiekunem naukowym został ówczas dr Krzysztof Wąsowicz, obecnie prof. dr. hab. Dziekan ds. Nauki na tymże Wydziale. Moje badania oraz prowadzone zajęcia dydaktyczne były głównie związane z biologią molekularną, gdyż mój opiekun naukowy był specjalistą w tym zakresie oraz wraz z nim prowadziłem przedmiot „Biologia molekularna” dla studentów Medycyny Weterynaryjnej”. W Katedrze Anatomii istniało wówczas unikalne Laboratorium Biologii Molekularnej, gdzie pod opieką Prof. Wąsowicza poznawałem tajniki technik molekularnych, w tym RT-PCR, hybrydyzację *in situ*, Western Blot, klonowanie i sekwencjonowanie DNA. Oprócz tego poznałem techniki tracingu neuronalnego oraz barwień immunofluorescencyjnych, które miały stanowić jedne z podstawowych technik w planowanej dla mnie pracy doktorskiej. Katedra Anatomii Zwierząt zajmowała się wtedy głównie badaniem unerwienia, źródłami pochodzenia oraz neurochemicznym kodowaniem zwojów unerwiających narządy rozrodcze świni domowej. Mój opiekun naukowy zaproponował temat, który miał być związany z unerwieniem macicy świni przez zwoj przyszyjkowy, jednak oprócz zbadania neurochemicznej charakterystyki tego zwoju oraz zbadania kodowania chemicznego neuronów unerwiających ten narząd, miał on polegać na zbadaniu odpowiedzi neuronów na uszkodzenie spowodowane aksotomią i związanym z tym deprivacją neuronów na czynniki neurotroficzne. Do tego celu miały zostać wykorzystane dobrze już opanowane na Katedrze techniki tracingu neuronalnego z użyciem tracersa Fast Blue oraz podwójne barwienia immunofluorescencyjne. Poza tym plan badań zawierał jak na owe czasy nowoczesne techniki biologii molekularnej, w tym RT-PCR, hybrydyzację *in situ* z sondami RNA oraz wykorzystanie mikroskopu konfokalnego, który od niedawna posiadała Katedra Anatomii Zwierząt. Źródłami finansowania badań były z początku fundusze Katedry, jednak później udało nam się otrzymać grant KBN „doktorski” (Nr 3 P06K 034 24, KBN „Wpływ aksotomii na kodowanie chemiczne neuronów zwoju przyszyjkowego unerwiających macicę świni.”). Ostatecznym celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie reakcji neuronów odpowiedzialnych

za unerwienie rogu macicy zlokalizowanych w zwoju przyszyjkowym (PCG) świni na aksotomię wywołaną histerektomią. Zbadałem ekspresję hydroksylazy tyrozyny (TH), hydroksylazy dopaminy (D $\beta$ H), acetylotransferazy cholinowej (ChAT), pęcherzykowego transportera acetylocholino (VACHT), neuronalnej syntetazy tlenku azotu (nNOS), neuropeptydu Y (NPY), naczynioaktywnego peptydu jelitowego (VIP), peptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylową (PACAP), galaniny, somatostatyny i substancji (SP) u zwierząt kontrolnych oraz eksperymentalnych. Zastosowałem metodę wstecznego znakowania aksonalnego w kombinacji z podwójnymi barwieniami immunofluorescencyjnymi w celu określenia kodowania neurochemicznego neuronów unerwiających róg macicy w warunkach fizjologicznych i po aksotomii, jak również metodę RT-PCR i hybrydyzację *in situ*. Stwierdzono, że badane neurony reagują na aksotomię jedynie spadkiem ekspresji TH i DBH oraz wzrostem ekspresji galaniny. Zaobserwowany wzrost ekspresji galaniny w wyniku uszkodzenia aksonu sugeruje, że neuropeptyd ten pełni także inną funkcję niż tylko neuromodulacja impulsu nerwowego. Uzyskane wyniki nakłoniły mnie do dalszego badania funkcji galaniny w mojej przyszłej pracy naukowej. Praca doktorska została obroniona 4.11.2005 z wyróżnieniem.

Oprócz badań związanych z doktoratem zwój przyszyjkowy świni był tematem innych prac badawczych, w których brałem czynny udział. Zwój przyszyjkowy jest głównym zwojem miednicznym samicy. Stanowi on swego rodzaju wyjątek, ponieważ jest to zwój, który zawiera zarówno neurony adrenergiczne jak i cholinergiczne. Jest więc ciekawym obiektem do badań. Badania te obejmowały m.in określenie dystrybucji i charakterystyki immunohistochemicznej neuronów zwoju przyszyjkowego unerwiających jajowód (**II.A.1**) oraz macicę (**II.A.2**) świni domowej.

W czasie studiów doktoranckich równolegle prowadziłem także badania mające na celu opisanie innych zwojów autonomicznych świni domowej oraz ich neurochemiczną charakterystykę. Scharakteryzowałem m.in. zwój skrzydłowo-podniebienny (**II.A.3**). W badaniach tych opisałem obecność wybranych neurotransmiterów bądź ich markerów w strukturach w/w zwoju z użyciem immunofluorescencji i mikroskopu konfokalnego oraz techniki RT-PCR. Wykazałem, że wszystkie neurony tego zwoju zawierają markery cholinergiczne: ChAT, VACHT, a także nNOS i VIP. Poza tym wykazałem obecność populacji neuronów zawierających somatostatynę, NPY, PACAP i galaninę. Nie stwierdziłem obecności neuronów adrenergicznych (TH-dodatnich) oraz zawierających SP lub CGRP. Opisałem także obecność włókien nerwowych na terenie tego zwoju. Technika RT-PCR wykryłem silny sygnał

dla transkryptów ChAT, somatostatyny, nNOS, VIP, NPY, PACAP i galaniny. W przypadku TH, SP i CGRP zaobserwowałem tylko bardzo słaby sygnał.

W tym okresie brałem także czynny udział w innych pracach badawczych realizowanych w Katedrze związanych z unerwieniem narządów świni domowej. M.in. zaangażowany byłem w badanie unerwienia adrenergicznego i cholinergicznego płuc (**II.A.4**), unerwienia nitrergicznego gruczołu mlekowego (**II.A.5**) oraz cholinergicznego i peptydergicznego dodatkowych gruczołów płciowych (**II.A.6**).

Także w tym okresie rozpoczęła się współpraca z Kierunkiem Biotechnologia, Wydziału Biologii, naszego Uniwersytetu, mojego promotora oraz mnie, polegającą na opiece nad magistrantami tego kierunku oraz ich badaniami do prac dyplomowych. Byłem recenzentem tych prac, a następnie promotorem (**II.J.2-6**). Jedne z pierwszych badań w ramach prac magisterskich w naszym Laboratorium Biologii Molekularnej dotyczyło technologii wytwarzania do celów naukowych i diagnostycznych przeciwciał ptasich. Stąd też zainteresowanie tym tematem oraz publikacja na temat wykorzystania tych przeciwciał (**II.A.7**).

Kilka miesięcy po obronie pracy doktorskiej wyjechałem na 9 miesięczny staż naukowy do Instytutu Biomedycyny/Anatomii Uniwersytetu w Helsinkach, Finlandia, gdzie dołączyłem do zespołu prof. Pertiego Panuli (h-index 63, ok. 14000 cytowań). Po tym okresie zaproponowano mi przedłużenie stażu o następnych 6 miesięcy w ramach zatrudnienia na Uniwersytecie w Helsinkach. Po następnych 6 miesiącach zdecydowałem się na powrót do Polski, choć otrzymałem propozycję na dalsze przedłużenie pobytu. W ciągu następnych lat utrzymywałem współpracę naukową z w/w ośrodkiem i powracałem tam kilkakrotnie (**III.L.3**). Łącznie na Uniwersytecie Helsińskim spędziłem ponad 2 lata. W pierwszym okresie mojego pobytu w Finlandii zostałem zaangażowany w 2 projekty: „Novel peptide receptors in the CNS and their role in brain functions.” oraz „Genetic control of neuronal degeneration in zebrafish *Danio rerio* (ZEBRAGEN)”. Pierwszy z nich polegał na zbadaniu nowego receptora dla peptydu odkrytego w ośrodkowym układzie nerwowym gryzoni. Kilkumiesięczne badania w tym projekcie wykazały, że receptor ten nie ma większego znaczenia u ludzi, dlatego też projekt ten został wstrzymany. Drugi natomiast projekt okazał się być dla mnie bardzo interesujący, gdyż wykorzystywał wówczas nowy organizm modelowy w badaniach naukowych – danio pręgowanego (*Danio rerio*, ang. zebrafish). Organizm ten posiada wiele zalet, które czynią go świetnym modelem w badaniach biomedycznych. Od tej chwili wszystkie moje wysiłki były skierowane na to, aby jak najlepiej poznać pracę z tym organizmem modelowym

oraz aby po powrocie do Polski wprowadzić go do moich badań. W owym czasie żaden ośrodek naukowy w Polsce nie wykorzystywał tego zwierzęcia laboratoryjnego do badań naukowych. Projekt z użyciem danio pręgowanego zakładał zbadanie funkcji genów związanych z ludzkimi chorobami neurodegeneracyjnymi w tym genów *Pitx3* i *Nurr1*. Gen *Pitx3* ulega ekspresji jedynie w dopaminergicznym neuronach śródmózgowia, a jego ekspresja jest potrzebna do aktywności motorycznej i przeżycia tej populacji neuronów. Inaktywacja tego genu powoduje apoptozę neuronów, w których fizjologicznie zachodzi ekspresja *Pitx3*, natomiast neurony, w których gen ten nie ulega ekspresji są oszczędzane. Zjawisko to bardzo przypomina to obserwowane w chorobie Parkinsona. Receptor *Nurr1* jest niezbędny do dojrzewania prekursorów neuronów dopaminergicznym śródmózgowia. Myszy pozbawione tego genu nie produkują hydroksylazy tyrozynowej, enzymu niezbędnego do syntezy katecholamin. Głównie te 2 geny stanowiły główny cel moich badań. Moim głównym zadaniem było zahamowanie ekspresji w/w genów u danio pręgowanego z użyciem antysensownych oligonukleotydów (morpholino MO). W tym celu do embrionów w stadium pierwszej komórki wstrzykiwałem MO skierowane przeciwko mRNA badanego genu. Następnie oceniałem wpływ braku ekspresji badanego genu na rozwój osobniczy, przeżywalność, morfologię oraz rozwój układu dopaminergicznego oraz behavior danio pręgowanego. W międzyczasie prowadziłem badania związane z genami z pierwszego projektu, jednakże w odniesieniu do danio pręgowanego. Projekt ten opierał się o bioinformatykę, RT-PCR, klonowanie i sekwencjonowanie. Poza tym w czasie mojego pobytu w Helsinkach w tym okresie badałem neuropeptydy RF-amidowe u danio pręgowanego. Jednakże wyniki tych badań nie zostały opublikowane, gdyż zabrakło mi czasu na dokończenie badań, a do czasu mojego ponownego powrotu do Helsinek ukazały się już publikacje z podobnymi wynikami opublikowane przez konkurujące grupy badawcze. Jednakże dzięki tym projektom poznałem zasady utrzymania i hodowli danio pręgowanego w warunkach laboratoryjnych, technikę hamowania translacji z użyciem antysensownych oligonukleotydów, poznałem technikę barwień immunofluorescencyjnych „whole mount” oraz sposób ich analizy z użyciem mikroskopu konfokalnego, poznałem techniki behawioralne i szereg innych, które po powrocie do kraju wdrożyłem w moje badania.

Jako że w moich poprzednich badaniach w trakcie doktoratu zainteresowałem się neuropeptydem galaniną, postanowiłem do zbadania jej funkcji użyć nowo poznany organizm modelowy. Już w czasie mojego pierwszego pobytu w Helsinkach rozpocząłem mój autorski projekt mający na celu zbadanie funkcji galaniny z użyciem danio pręgowanego jako

organizmu modelowego. Wtedy też rozpocząłem poszukiwania tego genu w genomie danio przęgowanego oraz rozpocząłem badanie jego dystrybucji na poziomie mRNA i białka.

Pobyt na Uniwersytecie w Helsinkach oraz moje wstępne badania galaniny zaowocowały wzięciem udziału w screeningu w ramach zebrafish-MODELS EU Integrated Project w Instytucie Biologii Rozwoju, Instytutu Maxa Plancka w Tübingen, w Niemczech w laboratorium laureatki nagrody Nobla: Prof. Christiane Nüsslein-Volhard (h-index 96, ok. 36000 cytowań) (**III.A.1, III.L.4**). W czasie pobytu w Instytucie zajmowałem się poszukiwaniem mutacji związanych z układem galaninergicznym w mózgu danio przęgowanego. W czasie 3 miesięcznego skreningu przeanalizowałem kilkadziesiąt tysięcy mózgów larw danio przęgowanego, co zaowocowało odnalezieniem kilku rodzin ryb z interesującymi mutacjami. Mutanty te zostały przesłane do laboratorium Prof. Panuli w Helsinkach, a prace nad identyfikacją mutacji były kontynuowane przez członków jego zespołu. W ciągu następnych kilkunastu miesięcy udało się zawężyć obszar poszukiwań szukanego genu do niewielkiego fragmentu chromosomu, jednakże projekt ten nigdy nie został dokończony powodu wejścia nowych technologii umożliwiających kierowaną mutagenezę i przez to łatwiejszą identyfikację efektów mutacji w genomie danio przęgowanego.

Po powrocie na rodzimy Uniwersytet w 2006 roku, postanowiłem wykorzystać umiejętności zdobyte za granicą i zacząłem wykorzystywać danio przęgowanego do swoich badań. Mimo tego, że organizm ten był już w świecie szeroko wykorzystywany w badaniach naukowych, w Polsce był praktycznie nieznan. Hodowla przeze mnie założona była więc pierwszą w Polsce hodowlą danio przęgowanego wykorzystywaną do badań naukowych. Dopiero 6 lat później pojawił się następny ośrodek wykorzystujący ten organizm do badań naukowych. Początki mojej pracowni były bardzo trudne, ze względu na brak zrozumienia ze strony polskiego środowiska naukowego oraz ograniczone środki finansowe. Przez następnych kilka lat pracowałem z tym organizmem modelowym jedynie ze studentami z koła naukowego.

W latach 2006-2009 byłem wykonawcą grantu Nr 2 P06K 005 30, KBN „Współzależność układów nerwowego i immunologicznego u świni w świetle badań morfologicznych.”. Główną ideą projektu było zbadanie relacji pomiędzy układem nerwowym, a włóknami nerwowymi zaopatrującymi niektóre narządy limfatyczne świni domowej i wybranymi komórkami układu immunologicznego zlokalizowanymi w tych narządach. Relacja ta została opisana na podstawie obserwacji struktury tych narządów w okresie postnatalnym, a także poprzez zbadanie wzajemnych związków morfologicznych pomiędzy dwoma badanymi układami w procesie patologicznym jakim był stan zapalny jelit towarzyszący dyzenterii świń



wywołanej doświadczalnie zakażeniem bakteriami *Brachyspira hyodysenteriae*. Zadanie to zostało zrealizowane za pomocą metod ilościowych (cytometria przepływowa, ELISA), oraz metod morfologicznych (pojedyncze i podwójne barwienia immunohistochemiczne). Moim głównym zadaniem było przygotowanie i wybarwienie komórek do cytometrii przepływowej oraz przygotowanie oraz analiza barwień immunohistochemicznych z użyciem mikroskopu konfokalnego. Wyniki tych badań zostały opisane we publikacjach z moim współautorstwem (**II.L.10,12,29**).

W 2008 roku odbyłem staż naukowy w Instytucie Haartmana w Katedrze Patologii, Uniwersytetu Helsińskiego, w zespole, którym przewodził prof. Erkki Hölttä (h-index 40, ok. 4900 cytowań, **II.L.5**). Badania z moim udziałem dotyczyły badania mechanizmów powstawania przerzutów ludzkiego czerniaka skóry. W badaniach tych porównaliśmy profile ekspresji genów w mikro- i makroprzerzutach czerniaka do węzłów chłonnych. Moje badania wykazały, że białka macierzy pozakomórkowej tworzą razem skomplikowane sieci wokół skupisk komórek nowotworowych w czerniaku i przerzutach raka sutka. Przeprowadzone analizy funkcjonalne sugerowały, że te nowo syntetyzowane sieci regulują adhezję, migrację i wzrost komórek nowotworowych, fibroblastów i komórek śródbłonka. Uzyskane wyniki wskazują, że zbadane białka macierzy pozakomórkowej, szczególnie periostyna i fibronektyna 1 mogą stanowić atrakcyjne cele dla opracowania nowych terapii przeciwko czerniakowi rozszanemu, rakowi piersi i ewentualnie innym nowotworom, poprzez wpływ na kluczowe procesy przerzutowania. Wynikiem tych badań jest publikacja z IF=5,224, MNiSW = 45pkt, 56 cytowań. w której jestem 2 autorem na 11 (**II.A.13**)

W latach 2009-2012 byłem wykonawcą grantu Nr N N308237936, KBN „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni.” Efektem tych badań były m.in. 2 publikacje (**II.A.15, 20**) w których jestem odpowiednio 2 i 3 autorem. W publikacji 1 (**II.A.15**) opisaliśmy wpływ T-2 na odpowiedź komórkową i humoralną w tkance limfoidalnej związanej z jelitami (GALT). Badanie to miało na celu zbadanie skutków długotrwałej ekspozycji na niskie dawki toksyny T-2 na zmiany odsetka limfocytów T CD4 + i CD8 +, podwójnie dodatnich limfocytów T CD4 + / CD8 +, limfocytów B CD21 oraz ekspresji interleukin IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 i IL-10 w kępkach Peyera w jelicie biodrowym świni. Celem drugiej publikacji (**II.A.20**) była charakterystyka odpowiedzi immunologicznej przebiegającej w węzłach biodrowo-okrężniczych (ICLN) u prawidłowych i traktowanych zearalenonem (ZEN) niedojrzałych płciowo samic świń. Zastosowana w eksperymencie dawka była na poziomie, który nie wywołuje dających się

zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL) w jajnikach, macicy i pochwie. Analiza koncentracji tkankowej cytokin wykonana testem immunoenzymosorpcyjnym (ELISA) wykazała w 28 dniu doświadczenia u świń otrzymujących ZEN podwyższony poziom cytokin produkowanych przez limfocyty pomocnicze Th1 (IL-2, IL-12 i IFN- $\gamma$ ). Poziom cytokin limfocytów pomocniczych Th2 (IL-4 i IL-10) w grupie eksperymentalnej cechowała nieistotna statystycznie tendencja wzrostowa w porównaniu do grupy kontrolnej. Cytometria przepływowa wykazała liniowy spadek odsetka limfocytów B CD21+, limfocytów T CD2+ i limfocytów T CD4+CD8- oraz wzrost odsetka komórek T CD8+CD4- i komórek TCR $\gamma\delta$ + u świń będących pod wpływem ZEN. Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), wykazano wzrastające w czasie stężenie ZEN i  $\alpha$ -ZEL ( $\alpha$ -zearalenolu) w wątrobie, a wyłącznie ZEN w badanych węzłach chłonnych. Uzyskane wyniki badań wykazały, że ZEN w stężeniu NOAEL przesuwa odpowiedź immunologiczną w ICLN świń w stronę Th1/Th17, jednocześnie prawdopodobnie pobudzając makrofagi fenotypu M1. Ponadto obserwowano wzrost wydzielania cytokin humoralnych, co można tłumaczyć ujemnym sprzężeniem zwrotnym oraz przechodzeniem makrofagów z fenotypu M1 na M2 oraz odpowiedzi Th1 na Th2. ZEN może, zatem wpływać na procesy wydzielania cytokin i kształtowanie odsetka limfocytów w węzłach chłonnych biodrowo-okrężniczych.

W 2009 roku zdobyłem grant Nr 552/MOB/2009/0 w ramach III edycji programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „Wsparcie międzynarodowej mobilności naukowców” pt. “The role of galanin in the development of zebrafish (*Danio rerio*). Organization of the galaninergetic system in the brain and correlation with other systems” (**III.A.2**). Grant ten realizowałem w następnym roku przez 9 miesięcy w ośrodku, który wizytowałem poprzednio kilkakrotnie (Neuroscience Centre, Institute of Biomedicine/Anatomy, University of Helsinki, **III.L.3**). W czasie tego pobytu miałem możliwość zapoznania się z nowymi technikami, które pojawiły się w Instytucie, ale przede wszystkim uzyskałem wyniki, które stanowią trzon pierwszej publikacji o galaninie u danio pręgowanego (**I.B.1**)

W po powrocie ze stażu w Helsinkach, w trakcie którego miałem możliwość zapoznać się z zaletami wykorzystania transgenicznych linii danio pręgowanego, zdecydowałem się na użycie na szerszą skalę zwierząt transgenicznych także w moim rodzimym ośrodku naukowym. Wymagało to zdobycia zezwolenia na „Zamknięte Użycie GMO”, ale także szerszej wiedzy na temat tworzenia i wykorzystania linii transgenicznych danio pręgowanego. W 2011 roku udało mi się zdobyć finansowanie na wyjazd do Sars International Centre for Marine Molecular

Biology w Bergen, do dr Maximiliano Suster (h-index 16, ok. 1700 cytowań, **III.L.6**), który jest ekspertem od transgenezy u danio pręgowanego. Wynikiem tej wizyty oprócz zdobytej wiedzy i doświadczenia, była próba przystąpienia wraz z dr Susterem do grantu w ramach POLISH-NORWEGIAN RESEARCH PROGRAMME pt. „Roles of galanin in zebrafish models of neurodegenerative and excitability disorders”.

W latach 2010-2013 byłem wykonawcą w grantie Nr N N308 233638, KBN „Udział substancji P i galaniny oraz ich receptorów w eksperymentalnie wywołanym stanie zapalnym okrężnicy”. Celem naukowym prowadzony w grantie badań było określenie wpływu stanu zapalnego okrężnicy, występującego w przebiegu dyzenterii wywołanej eksperymentalnym zakażeniem *B. hyodysenteriae*, na ekspresję substancji P i galaniny oraz receptorów dla tych neuropeptydów w błonie śluzowej i mięśniowej okrężnicy oraz wyizolowanych ze ściany okrężnicy limfocytach. Poziomy ekspresji obu neuropeptydów i ich receptorów były badane przy użyciu techniki real-time PCR. Badania ilościowe zostały uzupełnione badaniami prowadzonymi przy użyciu metody morfologicznej - hybrydyzacji *in situ*. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie, które struktury ściany okrężnicy są głównymi tkankami docelowymi dla obu neuropeptydów pojawiających się lokalnie w większych stężeniach tkankowych w przebiegu stanu zapalnego. Wyniki grantu zostały opublikowane w publikacjach, których jestem współautorem (**II.A.17, 18**).

W 2013 roku złożyłem wniosek o finansowanie projektu badawczego w ramach konkursu SONATA bis zatytułowany „Badanie funkcji galaniny z użyciem danio pręgowanego (*Danio rerio*) jako zwierzęcia modelowego.”. Niestety mimo dobrych recenzji od recenzentów zagranicznych w drugim etapie, wniosek nie uzyskał finansowania.

Poza tym nadal współpracuję z pracownikami Katedry Anatomii Zwierząt, gdzie broniłem doktorat i pracowałem wiele lat, w zakresie charakterystyki neuronów zaopatrujących narządy świni domowej. W wyniku tej współpracy ukazały się prace z moim współautorstwem (**II.A.14, 19, 22, 26**).

W celu zdobycia doświadczenia w zakresie stosowania metody RNA-Seq oraz wykorzystania modelu danio pręgowanego w badaniach związanych z akwakulturą, w maju 2014 r. odbyłem krótki wyjazd zagraniczny do ośrodka badawczego prof. Igora Babiaka (h-index: 24, 1511 cytowań,) na Uniwersytecie w Nordland w Norwegii. Wyjazd zagraniczny pozwolił mi nawiązać nowe kontakty, a także pomógł rozwinąć dotychczasowy warsztat badawczy i skutecznie kontynuować zaawansowane prace badawcze.

Praca naukowa wymaga ciągłego doskonalenia warsztatu badawczego oraz zdobywania kontaktów z wybitnymi naukowcami. W tym celu postanowiłem odbyć krótki staż w 2016 r na Uniwersytecie w Oslo, Norwegia w zespole dr. Camilla Esguerra (h-index 17, 1476 cytowań, **III.L.9**), którą poznałem wcześniej i która jest specjalistką od wykorzystania danio przęgowanego jako modelu w padaczce. Udało mi się zdobyć finansowanie w ramach Mechanizmu Finansowego EOG i Norweskiego Mechanizmu Finansowego. W czasie wyjazdu oprócz nawiązania współpracy zdobyłem wiedzę i umiejętności, które zostały wykorzystane w badaniach w publikacji z prezentowanego cyklu (**I.B.3**)

Ostatnie lata mojej działalności naukowej związane są z rozwojem utworzonej przeze mnie grupy badawczej, której nieformalnie przewodzę (Zebrafish Team [www.uwm.edu.pl/zebrafish](http://www.uwm.edu.pl/zebrafish)). Zajmuje się ona głównie badaniami funkcji neuropeptydów z użyciem danio przęgowanego jako organizmu modelowego, Utworzone przeze mnie laboratorium posiada w pełni funkcjonujący system do hodowli danio przęgowanego, gdzie obecnie jest utrzymanych ponad 20 różnych linii danio przęgowanego, w tym głównie linie transgeniczne oraz mutanty, wykorzystywane w naszych bieżących badaniach. Dzięki zdobytemu doświadczeniu za granicą w użyciu danio przęgowanego jako organizmu modelowego posiadam szeroką wiedzę na ten temat oraz prowadzę współpracę międzynarodową. Doktoranci, którzy należą do utworzonego przez mnie zespołu i których jestem/byłem promotorem pomocniczym, oprócz wiedzy i doświadczeniu zdobywanego w naszym laboratorium, zdobywają je jeszcze w trakcie wielu długoterminowych stażów naukowych, m.in. w Helsinkach, Pecz, Lejdzie.

Na bazie wielostronnej współpracy międzynarodowej pomiędzy naszym zespołem (Zebrafish Team) a Uniwersytetem w Pecz oraz Uniwersytetem w Helsinkach powstał projekt badawczy, który był podstawą pracy doktorskiej mojej doktorantki (promotor pomocniczy) obronionej w 2018r., pt. „Badanie funkcji polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylnową (PACAP)-38 w przebiegu uszkodzenia komórek rzęsatych przez czynniki prozapalne oraz stres oksydacyjny z użyciem danio przęgowanego (*Danio rerio*) jako organizmu modelowego”. Zasadniczym celem badań było wykazanie protekcyjnych właściwości polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylnową (PACAP-38) wobec komórek rzęsatych poddanych szkodliwemu działaniu stresu oksydacyjnego i czynników prozapalnych. W pracy wykazano, że PACAP-38 wykazuje działanie antyapoptotyczne na komórki rzęsate poddane stresowi oksydacyjnemu. Szczegóły ścieżki/mechanizmu odpowiedzialnego za antyapoptotyczny efekt PACAP-38 są niejasne. Można jednak wykluczyć udział szlaku kinazy

p-38 MAPK, ponieważ przeprowadzone badania wyraźnie wykazały brak wpływu PACAP-38 na aktywność w/w enzymu. Zaobserwowane na poziomie komórkowym protekcyjne właściwości PACAP-38 przekładają się na aspekt funkcjonalny, gdyż peptyd ten w badaniu behawioralnym w znacznym stopniu polepsza parametry ruchu po uszkodzeniu komórek rzęsatych linii nabocznej. PACAP-38 hamuje migrację neutrofilów w przebiegu stanu zapalnego, jednak nie zmienia poziomu nasilenia objawów nekrozy. PACAP-38 może działać bezpośrednio na neutrofile, gdyż wykazano, że w neutrofilach ulegają ekspresji wszystkie geny dla receptorów PACAP-38. PACAP-38 może też regulować migrację neutrofilów pośrednio, gdyż wykazano, że w przebiegu procesu zapalnego obniża poziom ekspresji IL-8, której działanie polega na stymulowaniu migracji neutrofilów. Wykazano także, że PACAP-38 ma istotny wpływ w przebiegu procesu zapalnego na ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną. Wyniki tych badań zostały opublikowane w publikacjach, w których jestem współautorem (**II.A.23, 30**).

Jestem także promotorem pomocniczym w 2 innych otwartych przewodach doktorskich, zatytułowanych „Wpływ galaniny na neurony motoryczne narażone na toksyczne działanie beta-N-metyloamino-L-alaniny w trakcie rozwoju danio pręgowanego (*Danio rerio*).” oraz „Rola galaniny w kształtowaniu odporności nieswoistej oraz w przebiegu infekcji bakteryjnej u danio pręgowanego (*Danio rerio*) jako organizmu modelowego”. Jednym z wyników pierwszego projektu jest wygenerowanie technologią CRISPR-cas9, w naszym laboratorium linii danio pręgowanego pozbawionego ekspresji galaniny. Stanowi on obecnie świetny model umożliwiający dalsze badanie przez nas funkcji galaniny. Drugi projekt jest realizowany jest w oparciu o finansowanie z grantu PRELUDIUM o tym samym tytule. Jak do tej pory moje doktorantki opublikowały 2 publikacje których jestem współautorem (**II.A.21, 25**) następne są w recenzji, bądź przygotowaniu.

Byłem też promotorem prac magisterskich, które za wyjątkiem pierwszej dotyczyły badań z użyciem danio pręgowanego. Na uwagę zasługuje fakt, że wszyscy moi magistranci po obronie kontynuują pracę naukową i obronili, bądź wkrótce obroną tytuł doktora.

Współpracuję też z grupą prof. Pawła Brzuzana z Katedry Biotechnologii w Ochronie Środowiska UWM w Olsztynie. W naszych badaniach wykorzystujemy m.in. danio pręgowanego do oceny wpływu zanieczyszczeń środowiska na organizmy kręgowców (**II.A.11, II.D.2**). Jestem opiekunem naukowym, doktoranta, którego kopromotorem jest prof. Brzuzan (**III.K.4**).

Zalety użycia danio pręgowanego w badaniach naukowych powodują, że coraz więcej naukowców spoza naszego ośrodka przyjeżdża do naszego laboratorium, także z zagranicy, na szkolenie i zwraca się do mnie z propozycją współpracy (<http://www.uwm.edu.pl/zebrafish/page5.html>). Pod koniec 2018 roku gościłem w naszym laboratorium dr. Ishaku Leo Elisha z Tshwane University of Technology, Pretoria, Republika Południowej Afryki, który przyjechał na staż w celu zapoznania się metodami wykorzystania danio pręgowanego w badaniach, a także by rozpocząć badania, które prowadzę w ramach współpracy z Prof. Alvaro Viljoen ([www.alvaroviljoen.com](http://www.alvaroviljoen.com)) z w/w Uniwersytetu. Jak do tej pory oprócz publikacji z Prof. Brzuzanem, w wyniku tej współpracy w ostatnich latach ukazały się następujące 2 publikacje (**II.A.24, 27**). Jednak kilka innych jest w recenzji bądź w przygotowaniu. Współpraca ta owocuje w postaci grantów badawczych z użyciem danio pręgowanego, w które jestem zaangażowany (2017/25/N/NZ7/01899, NCN, „Kumaryny jako potencjalne substancje o działaniu przeciwłękowym”), zostały złożone, bądź są w przygotowaniu.

***Zestawienie liczbowe dorobku naukowego (dotyczy wyłącznie publikacji pełnotekstowych) uwzględniająca rodzaj publikacji, punktację MNiSW oraz współczynnik wpływu (IF)***

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW*	IF
Prace oryginalne w czasopismach z listy JCR	30	770	46,803 (48,523)**
Prace oryginalne w czasopismach spoza listy JCR	1	10	0
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR	3	70	0,604 (2,923)
Prace przeglądowe w czasopismach spoza listy JCR	0	0	0
Łącznie	34	850	47,407 (51,446)**

\* Punktacja MNiSW za rok opublikowania publikacji. Dla publikacji sprzed 2013 padano punktację za rok 2013.

\*\*Doliczono IF publikacji, które w roku opublikowania nie posiadały jeszcze tego wskaźnika lub miały go dopiero naliczanego.

### ***Pozostałe dane bibliograficzne***

-liczba cytowań według bazy Web of Science = **333** (**304** bez autocytowań)

- liczba cytowań według bazy Scopus =**337**

- liczba cytowań według bazy Google Scholar =**439**

-indeks Hirscha według bazy Web of Science = **9**

- indeks Hirscha według bazy Scopus=**9**

-indeks Hirscha według bazy Google Scholar = **10**

## **6. Działalność organizacyjna oraz w zakresie popularyzowania nauki.**

Za moje najważniejsze osiągnięcie w zakresie popularyzowania nauki uważam zintegrowanie polskiego środowiska naukowego zainteresowanego wykorzystaniem danio pręgowanego jako organizmu modelowego. Po założeniu pierwszego w Polsce laboratorium oraz hodowli danio pręgowanego do celów naukowych poszukiwałem aktywnie naukowców, którzy byliby także zainteresowani wykorzystaniem tego organizmu modelowego w badaniach. Udało mi się odnieść ludzi oraz miejsca w których rozpoczynano bądź planowało się rozpoczęcie hodowli danio pręgowanego oraz wykorzystanie ich do badań naukowych. Odnalazłem naukowców z bogatym, wieloletnim doświadczeniem w użyciu tego organizmu modelowego zdobytego za granicą, którzy mieli rozpocząć organizację „zebrafish labs” w Polsce. Była to dr Małgorzata Wiweger z University of Leiden, Holandia, która miała zorganizować „zebrafish facility” w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie oraz prof. Przemko Tylżanowski z University of Leuven, Belgia, który miał zająć się organizacją badań z użyciem danio pręgowanego na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Poza tym udało mi się skontaktować z zespołem pani prof. Małgorzaty Daczewskiej z Instytutu Biologii Eksperymentalnej, na Uniwersytecie Wrocławskim, gdzie prowadzono już w tym czasie badania z użyciem tego organizmu modelowego. Wielokrotne

dyskusje oraz rozmowy inicjowane przeze mnie doprowadziły w końcu do utworzenia Polskiego Towarzystwa „Zebrafish” (Polish Zebrafish Society [www.zebrafish.org.pl](http://www.zebrafish.org.pl)), gdzie jestem członkiem Zarządu. W ramach Towarzystwa prowadzimy szeroko zakrojoną kompanię promującą wykorzystanie danio przęgowanego jako organizm modelowy w badaniach naukowych. W ciągu ostatnich lat organizm ten staje się w Polsce coraz bardziej popularny, co powoduje, że coraz większa liczba naukowców z Polski chciałaby poznać techniki wykorzystywane w badaniach z tym zwierzęciem. Dlatego, też jako Towarzystwo zdecydowaliśmy się na zorganizowanie Warsztatów, na których zaproszeni gości z zagranicy oraz my mogliśmy podzielić się wiedzą i umiejętnościami w zakresie wykorzystania danio przęgowanego w badaniach naukowych. W przeciągu niespełna 2 lat zorganizowaliśmy 4 edycje Warsztatów (**IIIC2,4-6**, <http://www.zebrafish.org.pl/>), w czasie których uczestnicy, za symboliczną opłatą, mieli okazję zapoznać się teoretycznie z modelem w czasie wykładów, zaprezentować swoje wyniki, a także nauczyć się szeregu technik w czasie zajęć praktycznych. Mój wkład w organizację Warsztatów oceniam na znaczący, gdyż oprócz organizacji przedsięwzięcia, zebrania funduszy od sponsorów, opracowałem i koordynowałem wszystkie zajęcia praktyczne w 3 pierwszych edycjach Warsztatów. Jako Towarzystwo planujemy także konferencję naukową, która ma się odbyć we wrześniu 2019 roku (**III.C.7**). Oprócz Polskiego Towarzystwa „Zebrafish” jestem także wieloletnim członkiem innych towarzystw naukowych: Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych – PolLASA (**III.H.1-4**).

Moje umiejętności organizacyjne można prześledzić także na przykładzie założonej i kierowanej przez mnie „Pracowni Neurobiologii i Rozwoju Danio Pręgowanego”. Pracownia ta obecnie jest wyposażona w profesjonalny system do hodowli danio przęgowanego, jednakże posiada także zaprojektowany i zbudowany przeze mnie system, który przez wiele lat świetnie spełniał swoją funkcję. Nadzoruję i organizuję funkcjonowanie pracowni, pozyskiwanie ryb do dalszych badań i utrzymanie już istniejących linii/szczepów. Dzięki moim staraniom pracownia ta ciągle się rozbudowuje i służy coraz liczniejszemu gronu naukowców pragnących wykorzystać danio przęgowanego w swoich badaniach.

Moja działalność w zakresie popularyzowania nauki objawia się także czynnym udziałem w licznych konferencjach zagranicznych i krajowych, podczas których wygłosiłem osobiście 10 referatów (**II.K.1-10**). Ponadto brałem też udział w innych konferencjach naukowych, gdzie prezentowałem swoje wyniki w formie plakatu (**III.B.1-69**). Dodatkowo, byłem członkiem komitetu organizacyjnego (Scientific Secretary), międzynarodowej konferencji naukowej „10th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer



Neuropeptide Conference” (**III.C.1**), a także Członkiem Komitetu Naukowego XLVI Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych (**III.C.3**).

W celu promowania nauki i badań własnych, niejednokrotnie udzielałem wywiadów i przygotowywałem materiały dla dziennikarzy z lokalnej prasy, czego efektem był program wyemitowany w TVP3 Lublin wyemitowany, 16.01.2018 z wywiadem ze mną, a także artykuły pojawiające się w periodyku Wiadomości Uniwersyteckie (**III.I.3d**). Za ważną uważam również moją aktywność w Internecie, która polega na tworzeniu i administrowaniu stron internetowych dotyczących działalności naukowej naszego Towarzystwa oraz zespołu ([www.zebrafish.org.pl](http://www.zebrafish.org.pl), [www.uwm.edu.pl/zebrafish](http://www.uwm.edu.pl/zebrafish)) a także promocji badań w formie postów publikowanych na bieżąco w mediach społecznościowych (**III.I.3e**).

W ramach popularyzacji nauki podczas Europejskiej Nocy Naukowców oraz Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki w ciągu kilku ostatnich lat, prowadziłem warsztaty dla przedszkolaków oraz uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych (**III.I.3**). Byłem wielokrotnie zapraszany do innych ośrodków naukowych (**III.I.3b**), a także na spotkania oddziałów Towarzystw Naukowych (**III.I.3c**), aby wygłosić wykład i podzielić się swoją wiedzą i umiejętnościami z zakresu wykorzystania danio przegowanego w badaniach naukowych.

Jestem również aktywnym recenzentem czasopism naukowych z listy JCR, dla których przygotowałem łącznie 28 recenzji w języku angielskim (**III.P**), a także 2 projektów naukowych, w tym jeden zagraniczny (**III.O**). Dodatkowo jestem członkiem Zespołu Doradczego do spraw Dobrostanu Zwierząt na moim rodzimym Wydziale (**III.Q.a**).

## **7. Działalność dydaktyczna (osiągnięcia dydaktyczne i sprawowana opieka naukowa nad studentami lub doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego).**

Działalność dydaktyczną rozpocząłem jeszcze na studiach doktoranckich od prowadzenia ćwiczeń z przedmiotu „Biologia Molekularna”, później „Genetyka Ogólna i Weterynaryjna” oraz „Anatomia Zwierząt” na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie. Kiedy w 2005 r. zostałem zatrudniony na stanowisku pracownika naukowo-dydaktycznego, w dużej mierze kontynuowałem prowadzenie dotychczasowych zajęć, ale prowadziłem również zajęcia dla studentów Wydziału Bioinżynierii (Anatomia Zwierząt) oraz Wydziału Biologii, kierunku Biotechnologia (Seminarium Magisterskie) UWM w Olsztynie

**(III.I.1).** Od 2013 prowadzę głównie ćwiczenia z przedmiotu „Patofizjologia Zwierząt”, a także „Genetyka Ogólna i Weterynaryjna” dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

W celu wzmocnienia potencjału dydaktycznego i podniesienia umiejętności językowych, w 2000 r. odbyłem dwa 1-miesięczne staże zagraniczne na Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Neapolu, Włochy **(III.L.1)** oraz na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Królewskiego Uniwersytetu w Gandawie, Belgia **(III.L.2)**, a w 2012 r. odbyłem 3-tygodniowy staż zagraniczny na Uniwersytecie Helsińskim w Finlandii **(III.L.7)**. Podczas pobytów zagranicznych miałem osobisty kontakt z pracownikami różnych wydziałów i uczestniczyłem w zajęciach z ich studentami, co pozwoliło mi zapoznać się z systemem kształcenia w wizytowanych krajach oraz poznać nowe metody nauczania.

Swoje umiejętności naukowo-dydaktyczne miałem możliwość wykorzystać poza moją rodzimą jednostką w kraju, a także za granicą. Dwukrotnie miałem możliwość prowadzić zajęcia w czasie „Zebrafish neurobiology course” na Uniwersytecie Helsińskim **(III.I.2a,b)**. Prowadziłem zajęcia na Studium Specjalizacji Użytkowania i Patologii Zwierząt Laboratoryjnych **(III.I.2c)**, prowadziłem szkolenie dla osób wykonujących procedury na zwierzętach **(III.I.2f)**, a także 4 krotnie prowadziłem ćwiczenia praktyczne w czasie „Zebrafish Workshops” **(III.I.2d,e,g,h)**.

Ponadto, byłem promotorem pomocniczym 1 doktoratu obronionego z wyróżnieniem w 2018 roku, jestem promotorem pomocniczym 2 następnych otwartych przewodów doktorskich, których obrona planowana jest na 2019, a także opiekunem naukowym 2 następnych doktorantów **(III.K)**. Byłem promotorem 5 prac magisterskich **(III.J.2-6)**, a także recenzentem 7 innych. W 2018 roku zgodziłem się zostać egzaminatorem zewnętrznym (external examiner) w rozprawie pt. „Development and validation of a post-traumatic stress disorder model in zebrafish” na Faculty of Health Sciences, North-West University, South Africa. Od wielu lat jestem także opiekunem naukowym studentów z koła „Anatomów Weterynaryjnych” oraz obecnie koła „Zebrafish” **(III.J.1)**.

18.02.2014

Piotr Podlasz