

Autoreferat

dr n. wet. Michał Wojciech Załęcki

Katedra Anatomii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

1. Imię i nazwisko

Michał Wojciech Załęcki

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

2004 Certyfikat: „Specjalista Systemu HACCP”, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

 Certyfikat: „Pełnomocnik Systemu HACCP”, TÜV Akademie Rheinland GmbH Niemcy

2004 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

2009 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

 Tytuł rozprawy doktorskiej: „Lokalizacja i kodowanie chemiczne zewnątrzpochodnych neuronów unerwiających zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2004 – 08.07.2009 Doktorant, Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

01.12.2009 – 30.09.2010 Pracownik techniczny na stanowisku specjalisty, Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

01.10.2010 – 31.10.2011 Asystent Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

01.11.2011 – do dziś Adiunkt, Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

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.)

4.1 Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

Śródściennie zstępujące projekcje nerwowe zaopatrujące zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej i wpływ eksperymentalnie wywoływanych owrzodzeń dystalnej części żołądka na plastyczność enterycznego układu nerwowego z uwzględnieniem zmian ekspresji wybranych neuropeptydów i ich receptorów w neuronach i tkankach.

Cykl ten obejmuje 4 oryginalne artykuły naukowe opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) w latach 2015 – 2019. Każde z czasopism jest zaklasyfikowane do pierwszego kwartyłu (Q1) w wybranej dziedzinie.

Łączna punktacja tych prac wynosi:

- według wykazu listy czasopism punktowanych MNiSW z dn. 26.01.2017 (za lata 2013–2016):

150 pkt

- łączny współczynnik oddziaływania, impact factor (IF) według daty publikacji:

11,869

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

4.2.1 The Influence of Antral Ulcers on Intramural Gastric Nerve Projections Supplying the Pyloric Sphincter in the Pig (*Sus scrofa domestica*)—Neuronal Tracing Studies. **Załęcki M.**; PLoS One. 2015 May 11; 10(5):e0126958. doi: 10.1371/journal.pone.0126958.

([Link do artykułu w wersji online](#))

IF=3,057; MNiSW=40 pkt; Q1

4.2.2 The Influence of Gastric Antral Ulcerations on the Expression of Galanin and GalR1, GalR2, GalR3 Receptors in the Pylorus with Regard to Gastric Intrinsic Innervation of the Pyloric Sphincter. **Załęcki M.**, Sienkiewicz W., Franke-Radowiecka A., Klimczuk M., Kaleczyc J.; PLoS One. 2016 May 13; 11(5):e0155658. doi: 10.1371/journal.pone.0155658.

([Link do artykułu w wersji online](#))

IF=2,806; MNiSW=40 pkt; Q1

- 4.2.3 Galaninergic intramural nerve and tissue reaction to antral ulcerations. **Zalecki M.**, Pidsudko Z., Franke-Radowiecka A., Wojtkiewicz J., Kaleczyc J.; Neurogastroenterol Motil. 2018 Jul;30(7):e13360. Epub 2018 May 2. doi: 10.1111/nmo.13360.

([Link do strony z artykułem](#))

IF= 3,842; MNiSW=30 pkt; Q1

- 4.2.4 Gastric ulcer induced changes in substance P and Nk1, Nk2, Nk3 receptors expression in different stomach localizations with regard to intrinsic neuronal system. **Zalecki M.**; Histochem Cell Biol 2019 Jan; 151(1):29-42. Epub 2018 Aug 28. doi: 10.1007/s00418-018-1715-4.

([Link do artykułu w wersji online](#))

IF= 2,164; MNiSW=40 pkt; Q1

Oświadczam, że:

Koncepcja przeprowadzonego eksperymentu jak i projekt wszystkich etapów badań są wyłącznie mojego autorstwa. Realizacja całego przedsięwzięcia naukowego była możliwa dzięki uzyskaniu przeze mnie finansowania na ten cel w ogólnopolskim konkursie „Juventus Plus” (grant nr. IP2012 044172), którego idea, zgodnie z założeniami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jest wsparcie finansowe badań naukowych prowadzonych przez wybitnych młodych naukowców. Zgodnie z zasadami tego konkursu cały wniosek przygotowywany był wyłącznie przez jednego naukowca, który był również kierownikiem i głównym wykonawcą. Dlatego samodzielnie wykonałem przeważającą większość badań i analiz. Z racji użytego gatunku (operacje wykonywane na świni domowej wymagają zespołu składającego się z kilku osób) oraz dużej liczby badanych zwierząt (symultaniczne pobieranie materiału w doświadczeniu terminalnym który wymaga natychmiastowej i ściśle określonej czasowo obróbki) przy przeprowadzaniu pewnych etapów eksperymentu towarzyszył mi zespół naukowców, którzy są współautorami dwóch publikacji 4.2.2 i 4.2.3. We wszystkich artykułach byłem wyłącznym autorem tekstu i rycin oraz samodzielnie przygotowałem układ pracy i zajmowałem się procesem ich publikacji. Udział prof. dr hab. Jerzego Kaleczycy w pracach wymienionych przy pozycjach 4.2.1.-4.2.5. był związany z konsultacjami, radami i uwagami krytycznymi dotyczącymi poprawności językowej i przejrzystości tekstu publikowanych prac.

W związku z powyższym swój udział w powstaniu cyklu w/w prac oceniam na:

100% – publikacje wymienione przy pozycjach 4.2.1, 4.2.4

80% – publikacje wymienione przy pozycjach 4.2.2, 4.2.3

4.3 Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

Region połączenia żołądkowo-dwunastniczego, czyli odźwiernik interesuje fizjologów zajmujących się układem pokarmowym od wielu lat, ponieważ „prawdopodobnie żadna część przewodu pokarmowego nie jest tak mocno związana z wszystkimi schorzeniami żołądka i dwunastnicy jak sam odźwiernik” (1). Pierwszych kontrowersyjnych doniesień dotyczących obecności mięśnia zwieracza odźwiernika dostarczył Horton w 1928 roku (2), który dokładnie przebadął 90 ludzkich żołądków. Swoją pracą dostarczył dowodów, iż odźwiernik jest kompletnym zwieraczem posiadającym mechanizmy kurczenia i rozszerzania. Analizę porównawczą umięśnienia tego regionu układu pokarmowego u człowieka i innych gatunków (królika, kota, psa, świni, osła i konia) przeprowadził Torgersen (3), który w swej pracy potwierdził występowanie mięśnia zwieracza odźwiernika w miejscu połączenia żołądkowo-jelitowego u wszystkich przebadanych gatunków. Autorzy badający odźwiernik u różnych gatunków zwierząt zgodnie twierdzą, iż cały ten segment przewodu pokarmowego funkcjonuje jako jedna jednostka, i różni się swoją budową jak i funkcją od sąsiadujących części - tj. jamy żołądka i dwunastnicy (4;5).

Zwieracz odźwiernika kontroluje przepływ treści pokarmowej pomiędzy żołądkiem – rezerwuarem odpowiedzialnym za mechaniczną i chemiczną (kwaśną) część trawienia, a dalszymi częściami układu pokarmowego – jelitami, w których prócz trawienia zachodzącego w środowisku alkalicznym, następuje wchłanianie cząstek pokarmowych. Mięsień ten dostosowuje przepływ treści żołądkowej do aktualnych potrzeb fizjologicznych organizmu selektywnie zatrzymując zbyt duże części stałe masy pokarmowej które mogłyby uszkodzić jelita, a jednocześnie zapobiega powracaniu treści o charakterze zasadowym z dwunastnicy do żołądka (tzw. refluks).

Skomplikowana budowa jak i funkcja pełniona przez mięsień zwieracz odźwiernika przyczynia się do bardzo złożonego sposobu unerwienia tego narządu. Wiadomo, iż mięsień zwieracz odźwiernika znajduje się pod ciągłą kontrolą zewnątrzpochodnych i śródściennych neuronów, choć dokładny mechanizm regulacji nerwowej do dnia dzisiejszego nie został poznany. Moje wcześniejsze badania dotyczące zewnątrzpochodnych źródeł unerwienia zwieracza odźwiernika żołądka świni wykazały istnienia nerwowych ośrodków autonomicznych unerwiających tę strukturę zlokalizowanych w kompleksie zwoju trzewnego i krezkowego przedniego – CSMG (6) i w obszarze obustronnych jąder parasympatycznych nerwu błędnego - (7). Źródła unerwienia czuciowego pochodziły z obustronnych zwojów dalszych (węzłowych) nerwu błędnego i zwojów rdzeniowych (7;8).

Neurony rozproszone na terenie ściany przewodu pokarmowego tworzące tzw. jelitowy układ nerwowy (ENS – Enteric Nervous System), stanowią wysoce zorganizowany system kontrolujący funkcjonowanie przewodu pokarmowego wykazujący silną autonomię działania. Organizacja struktur nerwowych tego układu pozwala na powstawanie lokalnych odruchów nerwowych, jak również odległych projekcji neuronalnych które swoim zasięgiem mogą obejmować oddalone od siebie

struktury. Ogromna liczba komórek nerwowych budujących ENS, porównywalna do liczby komórek zlokalizowanych w rdzeniu kręgowym, skłania niektórych badaczy do określania tego układu terminem „mózg jelitowy” (9). Wpływ regulacyjny układu nerwowego na mięśniówkę, naczynia krwionośne oraz nabłonki błon śluzowych odbywa się za pośrednictwem wydzielanych przez zakończenia nerwowe neurotransmiterów, do których zalicza się neurotransmitery klasyczne, takie jak acetylocholina i noradrenalina oraz bardzo różnorodne neurotransmitery peptydowe, takie jak neuropeptyd Y (NPY), naczynioaktywny peptyd jelitowy (VIP), substancja P (SP), somatostatyna (Som), galanina (Gal). Neurotransmitery oddziałują na komórki i tkanki docelowe ściany przewodu pokarmowego poprzez białka receptorowe zlokalizowane w ich błonach komórkowych. Zarówno neurotransmitery klasyczne, jak i neuropeptydy posiadają po kilka białek receptorowych, których ekspresja zachodzi w różnych komórkach i w różnych narządach co umożliwia powstawanie skomplikowanych powiązań regulacyjnych.

Większość badań dotyczących organizacji i funkcjonowania jelitowego układu nerwowego podejmuje zagadnienia z obszaru różnych odcinków jelit, podczas gdy prace zogniskowane na struktury nerwowe występujące na terenie żołądka stanowią zaledwie drobny odsetek. Wewnątrzpochodne unerwienie zwieracza odźwiernika wydaje się pełnić nadrzędną funkcję regulacyjną, dostosowując zakres otwarcia struktury do stopnia wypełnienia proksymalnej części żołądka i do stadium przygotowania treści pokarmowej do przepływu do dalszych części przewodu pokarmowego. Proces tej regulacji jest złożony i nie do końca poznany, choć ustalono, że wewnątrzpochodne unerwienie odźwiernika jest utworzone przez splot nerwów błony mięśniowej żołądka, które przechodząc przez odźwiernik wnikają do dwunastnicy (10;11). Wiele pęczków włókien nerwowych biegnie samodzielnie pomiędzy okrężnymi włóknami mięśniowymi. Zwoje śródścienne występujące na terenie ściany odźwiernika są rozproszone, a część z nich jest głęboko osadzona w warstwie okrężnej mięśnia zwieracza odźwiernika (12). Stymulacja nerwów śródściennych odźwiernika wywołuje relaksację i/lub skurcze fazowe mięśniówki zwieracza odźwiernika (13). Szczególne znaczenie wydają się mieć śródściennie zstępujące projekcje nerwowe zaopatrujące mięsień zwieracz odźwiernika, których perykariony zlokalizowane w bardziej proksymalnych częściach żołądka mogą bezpośrednio oddziaływać na funkcjonowanie narządu. Stymulacja mechanoreceptorów żołądka świni poprzez rozciąganie ściany żołądka udowodniła, że u tego gatunku jednym z mechanizmów regulujących przepływ treści przez odźwiernik jest stan napięcia ściany żołądka (14;15). Pomimo istotnej funkcji regulacyjnej wiedza neuroanatomiczna na temat zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika jest niekompletna i dotyczy niewielu gatunków takich jak gryzonie (10), czy zwierzęta poligastryczne (16), natomiast brak jakichkolwiek danych na temat pochodzenia i właściwości tych neuronów u świni domowej.

Zaburzenia w funkcjonowaniu zwieracza odźwiernika żołądka skutkują powstawaniem wielu jednostek chorobowych układu pokarmowego u ludzi i zwierząt, które można podzielić na dwie główne kategorie.

Pierwszą grupę stanowią schorzenia wynikające ze zbyt silnego zamknięcia zwieracza odźwiernika czego następstwem jest utrudnione opróżnianie żołądka - występują np. w przebiegu pylorostenozy niemowląt czy cukrzycy (17). Drugą grupę schorzeń stanowią stany wynikające z nadmiernego otwarcia światła odźwiernika co skutkuje niewłaściwie kontrolowanym przechodzeniem treści pokarmowej z żołądka do jelit (zbyt duże cząstki masy pokarmowej dostają się na teren jelit co prowadzi do złego trawienia, złego wchłaniania i w konsekwencji niedożywienia organizmu) oraz "w stronę przeciwną", do zarzucania treści jelitowej o charakterze alkalicznym na teren żołądka.

Jednym z najczęściej występujących schorzeń związanych z niedostatecznym zamknięciem mięśnia zwieracza odźwiernika jest powstawanie stanów zapalnych błony śluzowej żołądka prowadzących do powstawania owrzodzeń (18), mogących ostatecznie przekształcić się w zmiany nowotworowe (19-21). Przyczyną rozwoju stanu zapalnego błony śluzowej żołądka są głównie sole żółci, które wykazują niszczący wpływ na śluzówkę narządu (22). Refluks dwunastniczo-żołądkowy i owrzodzenia błony śluzowej żołądka należą do najczęstszych stanów patologicznych tego typu występujących u ludzi (23) oraz świń, u których opisywane są już od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku (24-26). W przypadku trzody chlewnej owrzodzenia żołądka są częstym schorzeniem, głównie dotyczącym tuczników dorastających oraz tuczników w końcowym etapie tuczu (z j. ang. grower / finisher pigs) (27;28). Krwawiące wrzody żołądka stanowią jedną z częstszych przyczyn upadków zwierząt w wieku od 3 do 6 miesięcy (29), natomiast zwierzęta z utajonymi wrzodami tego narządu wolniej przybierają na masie (27). W związku z szeroko rozpowszechnioną hodowlą świń stanowiącą istotny element gospodarki rolnej, wrzody żołądka występujące u tego gatunku mogą przyczyniać się do powstawania ogromnych strat ekonomicznych. Należy również zaakcentować znaczący wzrost popularności świń w eksperymentach biomedycznych (30-33) który wynika z podobieństw pod względem funkcjonowania i budowy anatomicznej wielu narządów do analogicznych struktur człowieka. Brak występowania specjalizacji pokarmowej upodabniający układ pokarmowy świni do układu pokarmowego człowieka (organizmy wszystkożerne) jest bardzo istotną cechą (34) pozwalającą na łatwiejszą ekstrapolację uzyskiwanych wyników do badań nad jednostkami chorobowymi tego układu u ludzi. Stąd świnka domowa jest szczególnie interesującym gatunkiem badawczym w tego typu doświadczeniach.

Owrzodzenia żołądka mogą występować w różnych częściach narządu. Znane jest występowanie wrzodów w regionie wpustu i trzonu żołądka (które mogą być określane jako owrzodzenia części proksymalnych żołądka), jak również w częściach dystalnych obejmujących okolicę jamy odźwiernika (usytuowane w różnej odległości od ujścia odźwiernikowego). W literaturze anglojęzycznej wrzody dystalnej części żołądka są określane wieloma terminami, takimi jak "Type I, Subtype 1: prepyloric ulcers" (35-37); "ulcers of prepyloric antrum" (38); "antral, pre-pyloric ulcers", "pyloric channel ulcers" (39). Co istotne, że jedynie wrzody zlokalizowane w dystalnej części narządu istotnie utrudniają proces opróżniania żołądka, podczas gdy wrzody zlokalizowane w proksymalnych częściach żołądka, jak również wrzody dwunastnicy przyspieszają ten proces (40;41). Ten specyficzny objaw został opisany

już w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia i określony w literaturze anglojęzycznej jako „pyloric syndrome complex” (42), choć bezpośrednia przyczyna tego zjawiska nie została do dziś określona.

Występowanie owrzodzeń błony śluzowej żołądka penetrujących ścianę narządu w której znajdują się elementy jelitowego układu nerwowego sugeruje możliwość bezpośredniego wpływu czynników uszkadzających na śródściennne struktury nerwowe narządu jak również na sąsiadujące tkanki ściany żołądka. Ogniskowe zmiany zlokalizowane w części odźwiernikowej żołądka, niejako „na drodze” śródściennych połączeń nerwowych zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika mogą wpływać na zasięg tych projekcji, a tym samym wywoływać zaburzenia regulacji pracy mięśnia zwieracza odźwiernika.

Wiadomym jest, iż układ nerwowy bierze udział nie tylko w regulacji procesów fizjologicznych, takich jak perystaltyka, ale także uczestniczy w patomechanizmie chorób o podłożu zapalnym oraz wpływa na procesy naprawcze. Odpowiedzią komórek nerwowych na działanie czynników uszkadzających jest zjawisko plastyczności neuronalnej polegające na zmianach adaptacyjnych wyrażonych poprzez zmiany fenotypu chemicznego tych komórek. Tego typu zmiany adaptacyjne mogą obejmować zwiększanie bądź zmniejszanie ekspresji wybranych neuroprzekaźników, jak również proces indukowania nowych genów przez reagujące komórki nerwowe. Poziom ekspresji receptorów dla substancji biologicznie aktywnych jest również regulowany w stanach patologicznych, co zmienia wrażliwość komórek i tkanek na te substancje – w ten sposób powstaje dodatkowe piętro regulacyjne. Zarówno stan zapalny jak i przecięcie wypustek nerwowych zaopatrujących dany narząd skutkuje dramatycznymi zmianami w fenotypie komórek unerwiających daną okolicę. Pośród obwodowych neuronów autonomicznych, neurony jelitowego układu nerwowego są uważane za szczególnie plastyczne w ich odpowiedzi na stan zapalny (43;44). Co bardzo istotne, w przewodzie pokarmowym występuje wyjątkowy mechanizm reakcji, dzięki któremu tkanki znacznie oddalone od bezpośredniego czynnika uszkadzającego mogą również odpowiadać na uszkodzenie (45). Zatem wrzód zlokalizowany w jamie odźwiernika może dodatkowo wywoływać reakcję tkankową w innych, proksymalnych i dystalnych regionach żołądka. Należy tu zaznaczyć, że indukowane zmiany adaptacyjne oprócz wspomagania neuronów jelitowych w przetrwaniu w warunkach patologicznych, mają także na celu kontrolowanie przebiegu stanu zapalnego i wspaganie regeneracji uszkodzonych tkanek. Wykazano, iż niektóre neurotransmitery, głównie neuropeptydy, związane są bardzo ściśle z powstawaniem i zejściem stanów zapalnych. Do neuropeptydów tych zalicza się głównie SP, NPY, VIP, Gal i Som. Niektóre z nich biorą udział w powstawaniu stanów zapalnych, np. SP, inne takie jak Gal i VIP wykazują wyraźny wpływ przeciwzapalny, ochronny i naprawczy w stosunku do zmienionych zapalnie tkanek.

Wcześniejsze badania eksperymentalne prowadzone w naszej jednostce wykazały zmiany ekspresji różnych biologicznie aktywnych substancji w chorobowo zmienionych tkankach przewodu pokarmowego świni (46-49). Neuropeptydem, którego ekspresja szczególnie wyraźnie ulegała zmianom

w przypadku wszystkich badanych układów eksperymentalnych była galanina, natomiast w niektórych odcinkach jelit znaczące różnice dotyczyły także ekspresji SP (49). Uzyskane dane wyraźnie wskazują, że Gal oraz SP odgrywają szczególną rolę w patomechanizmie stanu zapalnego przewodu pokarmowego świni przez co wysoce prawdopodobnym wydaje się być udział tych substancji w przebiegu owrzodzeń żołądka.

Galanina jako peptyd pierwotnie wyizolowany z jelita cienkiego świni (50), była badana w różnych układach eksperymentalnych dotyczących przewodu pokarmowego wielu gatunków zwierząt. Stwierdzono, że peptyd ten jest szeroko rozpowszechniony w całym przewodzie pokarmowym – występuje w neuronach jelitowych i we włóknach nerwowych zaopatrujących wszystkie warstwy ściany przewodu pokarmowego (51-55). Substancja ta moduluje szereg procesów biologicznych takich jak uwalnianie neuroprzekaźników, opróżnianie żołądka, wydzielanie kwasu solnego, sekrecja jelitowa oraz perystaltyka. Galanina oddziałuje na komórki i tkanki docelowe za pośrednictwem trzech typów receptorów związanych z białkami G: GalR1, GalR2 oraz GalR3. Receptor GalR1 występuje przede wszystkim na neuronach jelitowego układu nerwowego gdzie odpowiada za hamowanie przewodnictwa cholinergicznego (56). Obecność receptora wykazano również na komórkach nabłonkowych i enterochromafinowych (57) w których reguluje funkcje wydzielnicze (58). Receptor GalR2 występujący głównie na komórkach mięśniówki gładkiej układu pokarmowego gdzie odpowiada za jej aktywację prowadzącą do skurczu (59). Funkcja pełniona przez receptor GalR3 nie została jeszcze dokładnie określona na terenie przewodu pokarmowego. Nieliczne prace wskazują na szczególnie niski poziom jego ekspresji w tkankach tego układu (60;61). Wieloletnie badania eksperymentalne wykazały, iż galanina jest neuropeptydem istotnie zaangażowanym w przebieg stanów patologicznych różnych narządów. W badaniach tych obserwowano znaczące różnice ekspresji tego peptydu jak również wybranych receptorów galaninergicznych w tkankach objętych stanem zapalnym (62;63).

Substancja P występująca w wielu strukturach jelitowego układu nerwowego działa na tkanki docelowe poprzez 3 receptory tachykininowe: Nk1, Nk2, Nk3. W zależności od typu i lokalizacji pośredniczącego/aktywowanego receptora peptyd bierze udział w regulacji pracy mięśniówki (wpływając na perystaltykę) oraz błony śluzowej (regulując funkcje wydzielnicze) w różnych odcinkach przewodu pokarmowego. Peptyd odgrywa również bardzo istotną funkcję w patomechanizmie stanu zapalnego silnie wpływając (działanie chemotaktyczne) i modulując (synteza i uwalnianie interleukin, histaminy) funkcjonowanie komórek układu immunologicznego (64). Poziomy ekspresji substancji P oraz wybranych receptorów tachykininowych charakteryzują się znaczącymi wahaniami w przebiegu stanów patologicznych różnych odcinków przewodu pokarmowego (65-68). Co istotne, w niektórych eksperymentach wykazano, iż obserwowane zmiany w ekspresji peptydu ściśle korelowały ze stopniem zaburzeń motoryki i wydzielania występującym w uszkodzonych odcinkach przewodu pokarmowego (69).

Konfrontując opisane powyżej znaczenie funkcjonalne zwieracza odźwiernika, powszechność występowania owrzodzeń żołądka, znaczenie świń w gospodarce oraz badaniach biomedycznych i wyniki doświadczeń wykazujących zaangażowanie galaniny i substancji P w regulację pracy przewodu pokarmowego w stanie fizjologicznym i w przebiegu różnorodnych stanów patologicznych z brakiem jakichkolwiek informacji w tej tematyce u świń zdecydowałem się na przeprowadzenie badań w których wyróżniłem następujące zadania badawcze:

Zadania:

1. Określenie lokalizacji i zasięgu śródściennych zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej (Artykuł 4.2.1)
2. Określenie profilu neurochemicznego pod kątem wybranych neuropeptydów (galanina i substancja P) śródściennych zstępujących neuronów zaopatrujących zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej (Artykuł 4.2.2 ; 4.2.4)
3. Weryfikację wpływu owrzodzenia dystalnej części żołądka na:
 - a. zmianę zasięgu i dystrybucji śródściennych zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika żołądka (Artykuł 4.2.1)
 - b. zmianę ekspresji galaniny i substancji P w śródściennych zstępujących neuronach zaopatrujących zwieracz odźwiernika żołądka świni (Artykuł 4.2.2 ; 4.2.4)
4. Określenie ekspresji wybranych neuropeptydów w neuronach mięśniówkowych i podśluzówkowych występujących w różnych lokalizacjach ściany żołądka. Weryfikowane neuropeptydy to:
 - a. Galanina (Artykuł 4.2.2 ; 4.2.3)
 - b. Substancja P (Artykuł 4.2.4)
5. Weryfikację wpływu owrzodzenia dystalnej części żołądka na zmiany ekspresji wybranych neuropeptydów w neuronach mięśniówkowych i podśluzówkowych występujących w różnych lokalizacjach ściany żołądka. Weryfikowane neuropeptydy:
 - a. Galanina (Artykuł 4.2.2 ; 4.2.3)
 - b. Substancja P (Artykuł 4.2.4)
6. Weryfikację wpływu owrzodzenia dystalnej części żołądka na zmiany względnej ekspresji genów kodujących wybrane neuropeptydy i ich receptory (w odniesieniu do genu

referencyjnego GAPDH) w tkankach pochodzących z różnych lokalizacji ściany żołądka.

Weryfikowane geny kodujące:

- a. Galaninę i receptory GalR1, GalR2, GalR3 (Artykuł [4.2.2](#) ; [4.2.3](#))
- b. Substancję P (Tac1) i receptory Nk1, Nk2, Nk3 (Artykuł [4.2.4](#))

Zadanie 1

Pierwsze zadanie badawcze opiera się na hipotezie, iż śródściennie projekcje nerwowe z żołądka zaopatrują zwieracz odźwiernika świni domowej. Za taką przesłanką przemawia fakt, iż enteryczny układ nerwowy charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem rozwoju i autonomii, a w różnych odcinkach przewodu pokarmowego opisano występowanie śródściennych projekcji nerwowych zaopatrujących oddalone fragmenty tkanek. Co więcej, badania patofizjologiczne wykazały znaczące zmiany w funkcjonowaniu odźwiernika po eksperymentalnym przecinaniu ściany żołądka uszkodzającym śródściennie szlaki nerwowe.

W tym etapie eksperymentu badania zostały przeprowadzone na świniach zdrowych (n=6), u których przewód pokarmowy był w stanie fizjologicznym. Zastosowano technikę wstecznego znakowania neuronów z wykorzystaniem fluorescencyjnego znacznika neuronalnego o nazwie Fast Blue. Po odpowiednim przygotowaniu zwierząt przeprowadzono zabieg operacyjny w znieczuleniu ogólnym. W trakcie operacji wykonano iniekcję 20 µl znacznika neuronalnego Fast Blue (przy użyciu strzykawki Hamiltona) w mięsień zwieracza odźwiernika. Wykonywano 4 wkłucia po 5 µl znacznika. Igła była wprowadzona pod kątem prostym do powierzchni odźwiernika na głębokość ok 5-8 mm. Następnie znacznik neuronalny był deponowany na różnych poziomach głębokości mięśnia zwieracza w trakcie wysuwania igły ku powierzchni narządu. Po wstrzyknięciu ostatniej porcji znacznika igłę pozostawiono na około 30 sekund w miejscu iniekcji, po czym usuwano ją ze ściany narządu. Procedura ta zapobiegała wypływowi znacznika z miejsca iniekcji na zewnątrz. Po wykonanych operacjach i niezbędnych czynności pooperacyjnych zwierzęta były przetrzymywane w standardowych warunkach (pełny dostępem do paszy od dnia następującego po dniu zabiegu, stan zdrowia kontrolowany na bieżąco). Następnie przeprowadzono doświadczenie terminalne polegające na wprowadzeniu zwierząt w stan głębokiej narkozy farmakologicznej do momentu ustania akcji serca. Wówczas przeprowadzono transkardialną perfuzję 4% roztworem paraformaldehydu i pobierano materiał do badań (żołądek wraz z mięśniem zwieraczem odźwiernika oraz fragmentem dwunastnicy). Pobrany materiał był poddawany odpowiedniej obróbce (dotrwalanie, płukanie etc.). Następnie przygotowywano poprzeczne wycinki ściany żołądka o szerokości 0,5 cm pobrane w wyznaczonych odległościach od miejsca iniekcji znacznika (wycinek I—1,5 cm; wycinek II—3,5cm; wycinek III—5,5 cm; wycinek IV—7.5cm) z których przygotowano seryjne skrawki mikroskopowe przy użyciu kriostatu mroźniowego. Należy zaznaczyć, że celem precyzyjnego pobierania tkanek na potrzeby eksperymentu skonstruowano specjalny szablon który umożliwiał uzyskanie odpowiednich wycinków. Skrawki były analizowane z

wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego i konfokalnego Zeiss LSM 700. Obliczano ilość komórek zawierających znacznik neuronalny w preparatach pochodzących z każdego wycinka określając tym samym zasięg i rozmieszczenie śródściennych neuronów zstępujących zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika. Obliczano procentowy udział neuronów z każdego wycinka, a także określano wielkość wyznakowanych komórek wykorzystując dodatkowo technikę barwień immunohistochemicznych z użyciem przeciwciał pierwotnych skierowanych przeciwko pan-neuronalnemu markerowi PGP 9.5 (przeciwciało mysie) i odpowiednich przeciwciał wtórnych znakowanych fluoroscencyjnie (AlexaFluor 488). Wykonano dokumentację zdjęciową obrazów mikroskopowych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, iż wszystkie neurony zaopatrujące zwieracz odźwiernika należały do komórek splotozwoju mięśniówkowego. Średnia liczba wszystkich wyznakowanych perykarionów wynosiła $903,3 \pm 130,7$, a ich liczebność malała wraz ze wzrostem odległości od zwieracza odźwiernika [$76,1 \pm 6,7\%$ wyznakowanych neuronów obserwowano w wycinku I (w odległości 1,5 cm), $23,53 \pm 6,5\%$ w obrębie wycinka II (w odległości 3,5 cm)] i tylko sporadyczne komórki ($0,57 \pm 0,34\%$) w wycinku III, tj. oddalonym od mięśnia zwieracza o 5,5 cm. W związku z tym, iż w wycinku IV nie obserwowano wyznakowanych neuronów, zasięg zstępujących projekcji zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika w żołądku świni został określony na 5,5 cm. Sposób rozmieszczenia wyznakowanych neuronów również wykazywał istotne różnice w zależności od badanego wycinka – w wycinku I komórki występowały głównie w grupach 4-7 neuronów, choć obserwowano również zespoły składające się z 12 perykarionów, w wycinku II większość komórek występowała pojedynczo (sporadycznie obserwowano grupy obejmujące do 5 neuronów FB-pozytywnych), natomiast w wycinku III neurony występowały indywidualnie. Badania morfometryczne wykazały, iż zdecydowana większość komórek miała kształt owalny i mierzyła ok. $15,3 \pm 0,5 \times 22,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$.

Przeprowadzony eksperyment po raz pierwszy precyzyjnie wykazał i opisał rozmieszczenie śródściennych zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika w żołądku świni domowej. Choć istnienie zstępujących szlaków nerwowych na terenie enterycznego układu nerwowego było opisywane w jelitach i żołądku (70-72) badania z tego zakresu dotyczące zwieracza odźwiernika są sporadyczne i odnoszą się do niewielu gatunków, jak gryzonie (10;73), mięsożercy (74;75) czy przeżuwacze (16). Ogromna większość eksperymentów to badania patofizjologiczne w których wykorzystywano technikę przecinania lub uszkodzania śródściennych włókien nerwowych obserwując zmiany w funkcjonowaniu narządu. Do tego typu badań należą również wcześniejsze badania prowadzone u świń które wykazały, iż zstępujące projekcje nerwowe odgrywają znaczącą rolę w regulacji tempa opróżniania żołądka, w tym, pełnią kluczową funkcję w regulacji opróżniania płynów z żołądka (76). Do podobnych wniosków doszli autorzy wspomnianych wyżej badań prowadzonych na żołądkach zwierząt mięsożernych i gryzoni. Jedynym eksperymentem w

którym autorzy wykorzystali podobne techniki badawcze do prezentowanych w niniejszej dysertacji jest badanie przeprowadzone u jagnięcia (16), w którym zasięg ściennych neuronów trawieńca zaopatrujących zwieracz odźwiernika został określony na ok. 14 cm, a największy udział przypadł komórkom oddalonym o 8 cm od miejsca iniekcji znacznika. Obserwowane różnice w zasięgu występowania badanych neuronów mogą wynikać z różnej wielkości żołądka i/lub różnic wielkości komórek nerwowych (choć autorzy nie podają precyzyjnych wymiarów obserwowanych neuronów jagnięcia), lecz najprawdopodobniej są następstwem odmiennej budowy żołądka. Wszak żołądek zwierząt poligastrycznych wykazuje szereg znaczących różnic w stosunku do tego narządu u zwierząt monogastrycznych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazują istnienie śródściennych zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej i uwiadcniają charakterystyczny sposób rozmieszczenie tych komórek zależny od ich oddalenia od unerwianej struktury. Co więcej, uzupełniają dane funkcjonalne wykazujące istotną rolę pełnioną przez śródściennie zstępujące projekcje nerwowe w procesie regulacji pracy zwieracza odźwiernika i opróżniania żołądka (10;74-76).

Zadanie 2

Realizacja zadania miała na celu weryfikację właściwości neurochemicznych pod kątem ekspresji galaniny i substancji P w perykarionach tworzących śródściennie zstępujące projekcje nerwowe zaopatrujące zwieracz odźwiernika. Przeprowadzono serie podwójnych barwień immunohistochemicznych na mikroskopowych skrawkach mrożeniowych zawierających komórki wyznakowane znacznikiem neuronalnym Fast Blue. Barwienia zostały wykonane z wykorzystaniem surowic pierwotnych skierowanych przeciwko galaninie (przeciwciało królicze) i substancji P (przeciwciało szczurze) oraz odpowiednich przeciwciał wtórnych znakowanych fluorescencyjnie (AlexaFluor 488/555). Przeciwciała skierowane przeciwko pan-neuronalnemu markerowi PGP 9.5 (przeciwciało mysie) zostały wykorzystane w mieszaninie surowic pierwotnych do potwierdzenia neuronalnego charakteru obserwowanych struktur. Dodatkowo przeprowadzono serie barwień kontrolnych (z j. angielskiego: omission, replacement, preabsorption). Wybarwione skrawki analizowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w zestaw filtrów umożliwiających obserwację Fast Blue, AlexaFluor 488/555. W celu określenia wartości procentowych wyznakowanych komórek wykazujących immunoreaktywność dla Gal i SP (liczone niezależnie), obliczano ilość neuronów wykazujących symultaniczną ekspresję znacznika neuronalnego Fast Blue i badanego peptydu. Dla każdej z badanych substancji u każdego zwierzęcia zostało przebadanych po co najmniej 150 komórek FB-pozytywnych. Wykonano dokumentację zdjęciową obrazów mikroskopowych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 700.

Przeprowadzone badania wykazały, iż $20,3 \pm 2,16\%$ zstępujących komórek zaopatrujących odźwiernik wykazywało ekspresję galaniny, natomiast żaden z wyznakowanych perykarionów nie

zawierał substancji P. Należy tu szczególnie podkreślić, że wszystkie badania kontrolne weryfikujące prawidłowość zastosowanej metodyki (specyficzność przeciwciał, dodatkowe barwienia kontrolne z innymi rodzajami przeciwciał) potwierdziły jej właściwe działanie. Co więcej, inne grupy perykarionów (FB-negatywne) występujące w badanych skrawkach mikroskopowych wykazywały wyraźną immunoreaktywność dla substancji P.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy wykazały bezpośrednie zaangażowanie galaniny w śródścienną zstępującą regulację pracy mięśnia zwieracza odźwiernika świni domowej jednocześnie wykluczając udział substancji P w tej regulacji. Otrzymane dane są zgodne z wynikami prezentującymi pochodzenie włókien nerwowych zaopatrujących odźwiernik szczura (10) i korelują z główną funkcją pełnioną przez badane peptydy jak również z charakterystyką działania śródściennych szlaków nerwowych. W enterycznym układzie nerwowym śródściennie projekcje zstępujące pełnią przede wszystkim funkcje relaksacyjne, natomiast projekcje wstępujące aktywują mięśniówkę gładką (70-72;77). Ponieważ galanina może pełnić funkcję hamującą poprzez oddziaływanie na receptory GalR1 (78), natomiast substancja P jest uznawana za silny aktywator mięśniówki (79), uzyskane wyniki wpisują się w ogólny wzorzec śródściennych projekcji nerwowych i są zgodne z opisanymi powyżej zasadami regulacji motoryki przewodu pokarmowego. Należy tu podkreślić, że dane wykazujące obecność 61% komórek SP-immunoreaktywnych zaopatrujących zwieracz odźwiernika jagnięcia (16) istotnie różnią się od wyników przedstawionych u zwierząt monogastrycznych. Fakt zastosowania takich samych technik badawczych w eksperymencie prowadzonym u jagnięcia jednoznacznie wskazuje na występowanie różnic międzygatunkowych, które mogą wynikać ze specyfiki budowy żołądka przeżuwaczy. Przedstawione różnice uwidaczniają celowość wykonywania badań neuroanatomicznych na różnych gatunkach zwierząt i konieczność głębokiej analizy wyników przed bezpośrednim odnoszeniem ich do innych organizmów.

Zadanie 3

Podstawą przeprowadzenia zadania była hipoteza która zakłada, że owrzodzenia występujące w dystalnej części żołądka (niejako „na drodze” zstępujących szlaków nerwowych) mogą wpływać na śródścienną zstępującą projekcje nerwowe zaopatrujące odźwiernik, zmieniając:

- a) ilość i dystrybucję śródściennych zstępujących neuronów w zależności od odległości od mięśnia zwieracza odźwiernika (w przeprowadzonym eksperymencie ten aspekt badano z wykorzystaniem techniki wstecznego znakowania neuronów i mikroskopii konfokalnej)
- b) ekspresję galaniny i substancji P w śródściennych zstępujących perykarionach zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika

W grupie zwierząt doświadczalnych (n=6) wywoływano eksperymentalne owrzodzenie części odzwiernikowej żołądka z jednoczesnym znakowaniem wstecznym neuronów zaopatrujących zwieracz odzwiernika.

Procedury eksperymentalne były przeprowadzane w sposób podobny do opisanych w Zadaniu 1 (wykonywano mikroiniekcję znacznika Fast Blue) z tą różnicą, że podczas operacji dodatkowo wykonywano bilateralną iniekcję 1 cm³ 40% kwasu octowego w błonę podśluzową części odzwiernikowej ściany żołądka w celu wywołania owrzodzeń [zgodnie z metodyką określaną z j. anielskiego jako „acetic acid ulcer model” (80)]. Iniekcja była wykonywana przy wykorzystaniu strzykawki insulinowej z zespoloną igłą, co zapewniło właściwe zdeponowanie substancji. W celu uniknięcia wycieku roztworu na zewnątrz ściśle uciskano miejsce wkłucia sterylnym tamponem, który usuwano po 30 sekundach od momentu wyjęcia igły. Wszystkie zabiegi były przeprowadzane zgodnie ze sztuką lekarsko-weterynaryjną i wszelkie dostępne środki zostały podjęte celem minimalizacji cierpienia i bólu zwierząt uczestniczących w eksperymencie. Kolejne etapy badań (czynności pooperacyjne, przetrzymywanie zwierząt, doświadczenie terminalne, pobieranie i przygotowanie tkanek, analizy skrawków mikroskopowych) były przeprowadzane w sposób analogiczny do opisu zamieszczonego w Zadaniu 1. Zwierzęta wykorzystane w badaniach opisanych w Zadaniu 1, 2, 3 pochodziły z tej samej hodowli, a wszystkie eksperymenty prowadzone były równolegle w jednym czasie (w celu ujednolici warunków prowadzonych badań).

Wyniki uzyskane z grupy zwierząt zdrowych (z Zadania 1, 2) i doświadczalnych (z Zadania 3) zostały przeanalizowane statystycznie (GraphPad Software Inc., USA, ver. 6) z wykorzystaniem odpowiednich testów (test normalności rozkładu, test t-Studenta, test U Mann–Whitney’a).

Uzyskane dane wykazały, iż wrzody występujące w dystalnej części żołądka w znaczący sposób wpłynęły na zmniejszenie liczby śródściennych zstępujących perykarionów zaopatrujących zwieracz odzwiernika (z $903,3 \pm 130,7$ do $243,8 \pm 67,3$ komórek), a obserwowana różnica była istotna statystycznie. Zmniejszył się również zasięg występowania projekcji nerwowych (najdalsze wyznakowane neurony obserwowano w wycinku oddalonym o 3,5 cm od miejsca iniekcji znacznika, podczas gdy u zwierząt zdrowych odległość ta wynosiła 5,5 cm) oraz zmieniły się proporcje rozmieszczenia tych komórek w poszczególnych przekrojach ściany żołądka (w zależności od odległości od odzwiernika). Wymiary i kształty wyznakowanych perykarionów nie uległy zmianie w grupie zwierząt doświadczalnych.

Analiza preparatów mikroskopowych poddanych procedurze podwójnych barwień immunohistochemicznych nie wykazała statystycznie istotnych różnic w liczbie neuronów immunoreaktywnych dla galaniny i substancji P między zwierzętami zdrowymi, a doświadczalnymi.

Negatywne wyniki dotyczące występowania substancji P w neuronach wyznakowanych przez Fast Blue wykluczają partycypację tego neuropeptydu w śródścienną zstępującą regulacji pracy zwieracza

odźwiernika jak również negują zakładany udział SP w plastyczności neuronalnej tego typu szlaków nerwowych u zwierząt z owrzodzeniami części odźwiernikowej żołądka.

Uzyskane wyniki dają podstawę do powiązania wielokrotnie opisywanych problemów z opróżnianiem żołądka występujących u pacjentów z owrzodzeniami dystalnej części narządu (40-42;81) z zaburzeniami zstępujących projekcji nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika. Jednocześnie wykluczają udział badanych neuropeptydów w mechanizmie tego procesu. Chociaż nieliczni autorzy wysuwali hipotezę łączącą symptomy utrudnionego opróżniania żołądka z zaburzeniami funkcjonowania układu nerwowego (82), a nawet w badaniach histologicznych obserwowali nieprawidłowości w komórkach splotozwoju mięśniówkowego u pacjentów z wrzodami żołądka (83;84) to wyniki przedstawionego eksperymentu u świni są pierwszymi danymi analizującymi zaburzenia w zstępujących projekcjach nerwowych zaopatrujących zwieracz odźwiernika w przebiegu owrzodzeń żołądka. Prezentowane dane w sposób jednoznaczny wykazują uszkadzający wpływ tak zlokalizowanych owrzodzeń na śródścienne szlaki nerwowe.

Zadanie 4

Koncepcja zadania była oparta na hipotezie, iż ekspresja neuropeptydów w populacji komórek enterycznego układu nerwowego może wykazywać rozbieżności pomiędzy różnymi odcinkami przewodu pokarmowego, a nawet w obrębie różnych części tej samej struktury np. żołądka.

W badaniach wykorzystano tkanki pobrane od zwierząt zdrowych (n=6), u których układ pokarmowy był w stanie fizjologicznym. Procedura przygotowania tkanek do badań i wykonania mikroskopowych preparatów mrożeniowych była zbieżna z technikami opisanymi w Zadaniu 1 – ze ściany żołądków pobranych od zwierząt perfundowanych 4% roztworem paraformaldehydu wycinano jednocentymetrowe fragmenty (poprzecznie do osi długiej żołądka) w precyzyjnie ustalonej odległości od zwieracza odźwiernika, obejmujące obszar samego ujścia odźwiernikowego, jamy odźwiernika i trzonu żołądka (w przypadku badań ekspresji substancji P). Stosując technikę podwójnych barwień immunohistochemicznych (zgodną z opisem przedstawionym w Zadaniu 2) przygotowywano preparaty mikroskopowe z każdego pobranego wycinka ściany żołądka. Do analizy i liczenia komórek wykorzystano mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zestaw filtrów umożliwiających obserwację AlexaFluor488/555 oraz mikroskop konfokalny LSM 700. Minimalna odległość zawarta pomiędzy analizowanymi skrawkami mikroskopowymi pochodzącymi od jednego osobnika wynosiła co najmniej 100 μm – takie postępowanie wykluczyło wielokrotne liczenie tej samej komórki. Aby określić wartości procentowe komórek wykazujących immunoreaktywność dla Gal i SP (liczone niezależnie), obliczano ilość neuronów wykazujących symultaniczną ekspresję markeru neuronalnego PGP 9.5 i badanego peptydu. Dla każdej badanej lokalizacji u każdego zwierzęcia zostało przebadanych po co najmniej 300 PGP 9.5-immunoreaktywnych perykarionów podśluzówkowych i tyle samo mięśniówkowych. Analizowano również kształt i wielkość podśluzówkowych i mięśniówkowych komórek zawierających

galanine (wykorzystując oprogramowanie mikroskopu konfokalnego), a w przypadku wybranych grup neuronów analizowano również intensywność fluorescencji. W przypadku unerwienia galaninerгіcznego jamy odźwiernika przeprowadzono dodatkową analizę ilościową gęstości występowania włókien nerwowych w różnych warstwach ściany żołądka wykorzystując algorytmy specjalistycznego oprogramowania komputerowego (ImageJ 1.51n) w którym obliczano pole powierzchni sygnału fluorescencji oraz wykorzystywano makra nakładające siatkę Mertza.

a) Neurony Gal-immunoreaktywne

Analiza preparatów mikroskopowych wykazała, iż na terenie jamy odźwiernika $29,4 \pm 1,1\%$ neuronów mięśniówkowych i $65,7 \pm 0,5\%$ podśluzówkowych wykazywało ekspresję dla galaniny, podczas gdy w ścianie ujścia odźwiernika wartości te wynosiły odpowiednio $16,14 \pm 2,06\%$ i $64,84 \pm 2,74\%$. Na terenie ujścia odźwiernika większość galaninerгіcznych neuronów mięśniówkowych była zlokalizowana w głębokich warstwach mięśniówki okrężnej narządu (na różnych poziomach). Analiza morfometrycznych parametrów ciał komórkowych wykazała, iż neurony mięśniówkowe w większości charakteryzowały się kształtem okrągłym i/lub owalnym i mierzyły $26,9 \pm 1,06 \times 17,12 \pm 0,66 \mu\text{m}$, podczas gdy perykariony podśluzówkowe miały kształt owalny i wielkość $19,45 \pm 0,65 \times 11,33 \pm 0,38 \mu\text{m}$. Większość perykarionów charakteryzowała średnia i/lub duża intensywność immunofluorescencji, a precyzyjne obrazy konfokalne o wysokich powiększeniach wykazały, że immunoprecypitat barwień galaninerгіcznych układał się w sposób korelujący z subkomórkową lokalizacją peptydu na terenie pęcherzyków cytoplazmatycznych i aparatu Golgiego. Gal-immunoreaktywne włókna nerwowe obserwowane były we wszystkich warstwach ściany jamy odźwiernika (na terenie błony śluzowej, podśluzowej oraz mięśniówki okrężnej i podłużnej) a ich występowanie w wielu lokalizacjach było wysoce nieregularne. Jedynie na terenie okrężnej warstwy mięśniowej włókna charakteryzował bardziej regularny układ.

b) Neurony SP-immunoreaktywne

Analiza mikroskopowa wybarwionych preparatów wykazała, iż w grupie neuronów mięśniówkowych komórki wykazujące immunoreaktywność dla SP stanowiły: $12,4 \pm 1,6\%$ w ścianie trzonu żołądka, $14,9 \pm 1,5\%$ w ścianie jamy odźwiernika i $27,4 \pm 2,1\%$ w ścianie ujścia odźwiernikowego, populacji perykarionów tam zlokalizowanych. W grupie neuronów podśluzówkowych wartości te wynosiły odpowiednio: $67,1 \pm 5,4\%$, $62,8 \pm 1,4\%$ i $55,2 \pm 3,3\%$.

Uzyskane wyniki w sposób jednoznaczny wykazały istnienie znaczących różnic w ekspresji badanych neuropeptydów w śródściennych neuronach położonych w różnych częściach ściany żołądka świni. Obserwowane różnice dotyczą zarówno komórek mięśniówkowych jak i podśluzówkowych. To pierwsze dane wykazujące istnienie takiego zjawiska na terenie żołądka świni. Co więcej, porównanie

danych uzyskanych z tych samych wycinków żołądka wykazało, że badane neuropeptydy występują znacznie częściej w komórkach podśluzówkowych aniżeli w komórkach mięśniówkowych. Taki wynik sugeruje szczególnie istotną rolę pełnioną przez obydwa neuropeptydy w fizjologicznej regulacji funkcji komórek błony śluzowej. Dane funkcjonalne wykazujące wpływ galaniny na wydzielanie kwasu solnego w żołądku (85) oraz udział substancji P w regulacji transportu jonowego przez komórki nabłonkowe (86) silnie korelują z prezentowanymi wynikami neuroanatomicznymi.

Większość dostępnych publikacji naukowych opisujących wzór kodowania neurochemicznego śródściennych perykarionów żołądka nie uwzględnia precyzyjnych danych liczbowych, przez co odniesienie uzyskanych wyników do rezultatów opisanych w dostępnej literaturze jest utrudnione. Niemniej jednak w przekrojowych badaniach opisujących nerwowe struktury galaninerгіczne u wybranych gatunków zwierząt wykazano istnienie różnic w liczbie immunoreaktywnych struktur nerwowych pomiędzy różnymi odcinkami przewodu pokarmowego tj. przełykiem, żołądkiem, jelitami cienkimi i grubymi (52). Zauważono wzrost liczby Gal-immunoreaktywnych struktur (szczególnie włókien nerwowych) w kierunku dalszych (bardziej analnych) odcinków przewodu pokarmowego (zjawisko szczególnie silnie występowało na terenie jelit cienkich oraz grubych). Należy podkreślić, że nie zaobserwowano różnic w liczbie śródściennych perykarionów galaninerгіcznych na terenie różnych części żołądka gryzoni (wpust, trzon, odźwiernik), co znacząco odbiega od wyników uzyskanych w przeprowadzonym eksperymencie u świni.

Wykazany wzrost ilości mięśniówkowych perykarionów SP-immunoreaktywnych w kierunku dystalnym (odustnym) ściany żołądka świni (z ok 12% w trzonie żołądka, przez ok. 15% w jamie odźwiernika do ok 27% na wysokości ujścia odźwiernikowego), obserwowany w prezentowanym eksperymencie, silnie koreluje z gradientem immunoreaktywności SP ekstrahowanego z żołądka człowieka (87), a także z lokalizacją największej ilości miejsc wiązania substancji P występującą w odźwierniku żołądka kota (88).

Przedstawione wyniki potwierdzają udział badanych neuropeptydów w regulacji funkcjonowania błony śluzowej i mięśniówki różnych części żołądka świni domowej i wykazują istnienie różnic między poszczególnymi częściami tego narządu. Zaobserwowane rozbieżności w sposobie unerwienia żołądka gryzoni i podobieństwa do danych uzyskanych w badaniach tego narządu u człowieka wskazują na możliwość wykorzystania świni jako zwierzęcia modelowego w badaniach biomedycznych dotyczących schorzeń żołądka ludzi.

Zadanie 5

Idea badań była oparta na hipotezie, że wrzody występujące w części odźwiernikowej żołądka mogą wpływać na zmiany kodowania chemicznego śródściennych neuronów zlokalizowanych w tkankach bezpośrednio graniczących z uszkodzeniem, jak również w tkankach oddalonych od tego miejsca

(zlokalizowanych bardziej dystalnie, oraz proksymalnie – w przypadku badań dotyczących substancji P).

Badania zostały przeprowadzone na grupie 6 świń u których wywoływano eksperymentalne owrzodzenie części odźwiernikowej żołądka w sposób zbieżny z opisem z Zadania 3, z tą różnicą, że podczas operacji nie wykonywano czynności związanych z iniekcją znacznika neuronalnego. Punkt iniekcji kwasu octowego był ustalany w ten sposób, ażeby tworzące się wrzody były zlokalizowane w miejscu graniczącym z wycinkiem ściany jamy odźwiernika pobieranym od zwierząt zdrowych (opisanych w Zadaniu 4). Procedury następujące tj. przetrzymywanie zwierząt, doświadczenie terminalne, pobieranie i przygotowanie tkanek do badań, wykonywanie i barwienie preparatów mikroskopowych, analizy mikroskopowe, dokumentacja zdjęciowa były wykonywane zgodnie z opisem umieszczonym w zadaniu 4.

Zwierzęta wykorzystane w badaniach opisanych w Zadaniu 4 i 5 pochodziły z tej samej hodowli a wszystkie eksperymenty prowadzone były równolegle w jednym czasie (w celu ujednolicia warunków prowadzonych badań).

Wyniki uzyskane od zwierząt zdrowych (z Zadania 4) i doświadczalnych (z Zadania 5) analizowano statystycznie wykorzystując odpowiednie testy (test normalności rozkładu, test t-Studenta, test U Mann–Whitney’a).

a) Neurony Gal-immunoreaktywne

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że na terenie ściany ujścia odźwiernika zwierząt z owrzodzeniami dystalnej części żołądka, odsetek mięśniówkowych perykarionów zawierających galaninę wzrósł z $16,14 \pm 2,06\%$ do $25,5 \pm 2,07\%$ i różnica ta była istotna statystycznie, natomiast w tkankach bezpośrednio graniczących z wrzodem (jama odźwiernika) zmiana w tej grupie neuronów nie wykazywała istotności statystycznej (wzrost z $29,4 \pm 1,1\%$ do $30,8 \pm 0,8\%$). Sytuacja odwrotna była obserwowana w przypadku grupy neuronów podśluzówkowych, w której istotny statystycznie wzrost dotyczył wycinka tkanki bezpośrednio graniczącej z owrzodzeniem ($65,7 \pm 0,5\%$ do $68,6 \pm 1,2\%$), natomiast nie występował na terenie oddalonej ściany ujścia odźwiernika (wzrost z $64,84 \pm 2,74\%$ do $68,16 \pm 2,49\%$). Gęstość i przebieg włókien Gal-immunoreaktywnych występujących w tkankach graniczących z wrzodem nie uległy zmianom pod wpływem występujących owrzodzeń. Właściwości morfometryczne większości wybarwionych komórek nie wykazywały istotnych różnic między badanymi grupami zwierząt, choć niektóre neurony mięśniówkowe w tkankach zwierząt z owrzodzeniami charakteryzowały się mniej intensywną immunofluorescencją i/lub większymi wymiarami.

b) Neurony SP-immunoreaktywne

Uzyskane dane wykazały, że u zwierząt z owrzodzeniami liczba mięśniówkowych SP-immunoreaktywnych perykarionów wzrosła w sposób istotny statystycznie we wszystkich badanych wycinkach żołądka, tj. w tkankach bezpośrednio graniczących z owrzodzeniem (jama odźwiernika: $14,9 \pm 1,5\%$ do $23,9 \pm 1,3\%$) jak również w tkankach oddalonych, tj. położonych proksymalnie (trzon żołądka: $12,4 \pm 1,6\%$ do $25,8 \pm 4,5\%$) i dystalnie (ujście odźwiernika: $27,4 \pm 2,1\%$ do $35,3 \pm 1,9\%$). Liczba komórek podśluzówkowych nie wykazała istotnych statystycznie różnic w żadnej z badanych lokalizacji między grupą zwierząt zdrowych i eksperymentalnych.

Przeprowadzony eksperyment wykazał, że u zwierząt z owrzodzeniem dystalnej części żołądka komórki enterycznego układu nerwowego zlokalizowane bezpośrednio przy ognisku patologicznym jak i oddalone od tego miejsca podlegają zjawisku plastyczności neuronalnej w którą zaangażowane są obydwie badane neuropeptydy. Co znamienne, odpowiedź neuronalna nie dotyczy wszystkich grup komórek w jednakowym stopniu, a ograniczona jest do precyzyjnie określonych grup neuronów w zależności od położenia w narządzie i odległości od czynnika uszkodzającego. Tym samym, istnienie zjawiska rozległej reakcji tkanek przewodu pokarmowego na ogniskowe uszkodzenia opisywane dotąd wyłącznie na terenie jelit (45) zostało po raz pierwszy potwierdzone na terenie tkanek żołądka. Choć, zaangażowanie galaniny (62;63) oraz substancji P (64) w rozwój, przebieg i regulację procesów zapalnych toczących się na terenie różnych narządów, w tym struktur układu pokarmowego było opisywane przez badaczy, to ogromna większość eksperymentów dotyczyła reakcji tkanek bezpośrednio objętych stanem zapalnym. W tego typu badaniach stan zapalny wywoływany eksperymentalnie [poprzez podawaniem patogenów bakteryjnych (46-49;65;66;89-91) lub pasożytów (69;92)] bądź występujący naturalnie (93-95) obejmował rozległy obszar ściany przewodu pokarmowego. Wyniki przedstawionego eksperymentu są unikatowe, gdyż jednoznacznie wykazały plastyczność śródściennych neuronów żołądkowych oddalonych od bezpośredniego kontaktu z uszkodzoną tkanką. Szczególnie interesująca wydaje się być rozległa odpowiedź komórek splotowzwoju mięśniówkowego, których główna funkcja polega na zaopatrzeniu struktur mięśniowych narządu. Przedstawione wyniki, uzyskane w badaniach przeprowadzonych na organizmie świni – monogastrycznym zwierzęciu wszystkożernym, wydają się ściśle korelować z symptomami utrudnionego opróżniania żołądka obserwowanymi w przebiegu owrzodzeń dystalnej części żołądka ludzi, co sugeruje możliwość ich wykorzystania w przyszłych eksperymentach biomedycznych.

Zadanie 6

Przeprowadzone badanie opierało się na hipotezie, że owrzodzenia dystalnej części żołądka wywołujące opisaną powyżej plastyczność neuronalną w różnych wycinkach ściany narządu wpływają również na zmiany ekspresji genów kodujących badane neuropeptydy oraz ich receptory w tych lokalizacjach. W związku z niedostępnością przeciwciał skierowanych przeciwko świńskim receptorom galaninowym i

tachykininowym oraz danym podważającym specyficzność takich barwień u innych gatunków zwierząt (96), zastosowanie techniki Q-PCR było jedyną dostępną metodą umożliwiającą weryfikację zmienności ekspresji tych receptorów. Jest to szczególnie ważne w kontekście dodatkowego „receptorowego” pietra regulującego oddziaływania uwalnianych neuropeptydów na komórki tkanek docelowych. Metodyka wykorzystana w tej części badań, w przeciwieństwie do wcześniej opisanych barwień immunohistochemicznych i badań tracingowych, wymaga tkanek niepoddanych działaniu paraformaldehydu, przez co niemożliwe było wykorzystanie prób pozyskanych od zwierząt użytych we wcześniej opisanych badaniach.

Eksperyment został przeprowadzony na 2 grupach zwierząt (pozyskanych z tej samej hodowli, w tym samym wieku, o podobnej masie jak osobniki wykorzystane w pozostałych badaniach): świniach zdrowych (n=6) oraz zwierzętach doświadczalnych (n=6) u których wywoływano eksperymentalne owrzodzenie dystalnej części żołądka zgodnie z metodyką opisaną w Zadaniu 3 (z modyfikacjami uwzględnionymi w opisie z Zadania 5). W siódmym dniu po zabiegu wykonywano doświadczenie terminalne w którym zwierzęta poddane głębokiemu znieczuleniu były wykrawiane. Z pobranych żołądków były wycinane próby o średnicy 1 cm (przy wykorzystaniu okrągłego trepanu) zawierające wszystkie warstwy ściany narządu. Wycinki były pobierane w precyzyjnie ustalonych lokalizacjach ściśle korelujących z miejscami pobierania prób do barwień immunohistochemicznych opisanych w Zadaniu 4 i 5 i umieszczane w odczynniku RNALater. Z pobranych tkanek izolowano RNA (nieznacznie modyfikując metodę w związku z dużą grubością ściany żołądka świni), przeprowadzano odwrotną transkrypcję uzyskując komplementarny DNA który służył do wykonania reakcji Real-Time PCR z odpowiednio zaprojektowanymi starterami dla genów kodujących: dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego – GAPDH (jako gen referencyjny), galaninę, receptory galaninowe: GalR1, GalR2, GalR3, Tac 1 (gen kodujący substancję P), receptory tachykininowe: Nk1, Nk2, Nk3. Poziomy ekspresji każdego z genów znormalizowano względem genu referencyjnego. Wyniki uzyskane z grupy zwierząt zdrowych i doświadczalnych analizowano statystycznie wykorzystując odpowiednie testy (test normalności rozkładu, test t-Studenta, test U Mann–Whitney’a).

a) Geny kodujące galaninę i receptory GalR1, GalR2, GalR3

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że względna ekspresja genu kodującego galaninę wzrosła jedynie na terenie ściany ujścia odźwiernikowego żołądka zwierząt eksperymentalnych, podczas gdy w tkankach bezpośrednio graniczących z owrzodzeniem nie uległa zmianie. Ekspresja wszystkich receptorów galaninergicznych (GalR1, GalR2, GalR3) wzrosła w tkankach bezpośrednio graniczących z wrzodem, natomiast na terenie ujścia odźwiernikowego wzrost dotyczył tylko ekspresji receptora GalR1 (ekspresja receptorów GalR2, GalR3 nie wykazała zmian istotnych statystycznie).

b) Geny kodujące substancję P (Tac1) i receptory Nk1, Nk2, Nk3

Przeprowadzone badania wykazały, że względna ekspresja genu kodującego substancję P (Tac1) wzrosła jedynie w tkance trzonu żołądka tj. lokalizacji położonej proksymalnie w stosunku do owrzodzenia, podczas gdy w tkankach graniczących bezpośrednio z owrzodzeniem (jama odźwiernika) jak i w tkankach leżących dystalnie (ujście odźwiernika) obserwowany wzrost nie był istotny statystycznie. Zbieżne wyniki dotyczyły ekspresji receptora Nk1. Ekspresja receptora Nk3 uległa istotnemu wzrostowi we wszystkich badanych lokalizacjach, natomiast receptor Nk2 drastycznie zmniejszył swoją ekspresję w tkankach bezpośrednio graniczących z owrzodzeniem (jama odźwiernika), istotnie zwiększył w tkankach leżących dystalnie (ujście odźwiernika) i nie zmienił w lokalizacji położonej proksymalnie w stosunku do owrzodzenia (trzon żołądka).

Przedstawione wyniki są pierwszymi dostępnymi danymi dotyczącymi ekspresji badanych genów w tkankach żołądka świni domowej – w literaturze światowej nie zostały dotychczas przedstawione żadne tego typu dane ani u świń zdrowych, ani w przypadku jakichkolwiek stanów patologicznych narządu. Co szczególnie istotne, zastosowana technika umożliwiła po raz pierwszy wykazanie obecności mRNA kodującego badane receptory w tkankach żołądka świni, tym samym potwierdzając ich występowanie w ścianie tej struktury. Dotychczasowe badania wykorzystujące barwienia immunohistochemiczne nie pozwalały w sposób wiarygodny wykazać występowania receptorów galaninerгіcznych w tkankach zwierząt (96), a niedostępność przeciwciał zaprojektowanych przeciwko receptorom tachykininowym świni również utrudniała uzyskanie w pełni wiarygodnych wyników dotyczących tych receptorów w przewodzie pokarmowym świni.

Przeprowadzony eksperyment wykazał, iż owrzodzenie dystalnej części żołądka wpływa na zmiany ekspresji badanych genów w sposób bardzo precyzyjny, zależny od lokalizacji badanej tkanki w stosunku do owrzodzenia i analizowanego genu. Należy tu szczególnie podkreślić, iż poziomy ekspresji genów były określane w całym przekroju ściany żołądka, przez co oprócz śródściennych neuronów zawierały wiele innych typów komórek (jak na przykład komórki nabłonkowe, fibroblasty, adipocyty, miocyty, komórki glejowe i komórki układu immunologicznego), natomiast techniką barwień immunocytochemicznych (doświadczenie opisane w Zadaniu 4 i 5) precyzyjnie określano ekspresję badanych neuropeptydów wyłącznie w populacji neuronalnej. Fakt ten tłumaczy niezupełną korelację istotności statystycznej niektórych wyników ilościowych dotyczących badanych neuropeptydów i genów je kodujących uzyskanych metodą barwień immunohistochemicznych i techniką Real-Time PCR (np. wzrost liczby Gal-immunoreaktywnych neuronów podśluzówkowych w tkankach bezpośrednio graniczących z wrzodem i brak zmian ekspresji genu kodującego galanine w tym regionie). Niemniej jednak w przypadku badań dotyczących receptorów, określanie ich ekspresji we wszystkich tkankach danej lokalizacji wydaje się być szczególnie uzasadnione, gdyż uwalniane neuropeptydy mogą oddziaływać na wszystkie komórki tam występujące. Odnotowane wzrosty ekspresji receptorów

galaninergetycznych i tachykininowych w tkankach graniczących z owrzodzeniem wydają się być zgodne z większością doniesień wykazujących podobną tendencję wzrostową w przebiegu stanów zapalnych różnych narządów występujących u różnych zwierząt (62;63;97). Na uwagę zasługuje fakt, że artykuły opisujące zmiany ekspresji receptorów GalR2 i GalR3 są bardzo nieliczne (91;98), a prezentowane badania po raz pierwszy w historii wykazały zmiany ich ekspresji w tkankach żołądka. Wyniki dotyczące receptorów tachykininowych wydają się być równie przełomowe. Przeprowadzone eksperymenty po raz pierwszy w historii wykazały wzrost ekspresji receptora NK3 w tkankach przewodu pokarmowego objętego stanem patologicznym, i co nie mniej istotne, dowiodły iż reakcją są objęte również tkanki oddalone od bezpośredniego uszkodzenia. Równie interesujące wydają się być wyniki wykazujące znaczące różnice w ekspresji receptora NK2 w zależności od badanego wycinka żołądka, które silnie wiążą się z lokalizacją tego receptora na komórkach mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego i ich działaniem skurczowym (79). Obserwowany wzrost ekspresji receptora wyłącznie w tkankach zwieracza odźwiernika, silnie korelujący z największą jego ekspresją w odźwierniku człowieka i kota (87;88), wydaje się bezpośrednio wspierać przedstawioną wcześniej hipotezę dotyczącą zaangażowania tachykinin w zjawisko utrudnionego opróżniania żołądka występującego u pacjentów z owrzodzeniami dystalnej części narządu. Ogromny spadek ekspresji receptora Nk2 w miejscu bezpośrednio graniczącym z uszkodzeniem, odmienny od większości dostępnych wyników opisujących wzrost jego ekspresji w przebiegu stanów zapalnych, wydaje się wynikać z silnego uszkodzenia tkanki mięśniowej przez głęboko penetrujący wrzód. Część uszkodzonych komórek mięśniowych mogła ulec atrofii, co wpłynęło na zmianę ekspresji receptora. Za taką tezę wydają się przemawiać również wyniki uzyskane we wcześniejszych badaniach nad zapaleniem okrężnicy świń, w których wykazaliśmy znaczący spadek ekspresji receptora GalR2 w tkankach silnie uszkodzonych przebiegającym stanem zapalnym (91). Przedstawione rozbieżności w zmianach ekspresji receptora w zależności od prowadzonego eksperymentu jednoznacznie wskazują na konieczność indywidualnego rozpatrywania różnych stanów patologicznych i ostrożność w bezpośrednim odnoszeniu uzyskanych wyników do innych jednostek chorobowych.

4.4 Podsumowanie i wnioski:

Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały, że:

1. Mięsień zwieracza odźwiernika świni jest unerwiony poprzez śródściennie zstępujące projekcje nerwowe których najbardziej odległe / oddalone perykariony leżą na terenie ściany żołądka w odległości ok. 5.5 cm od zaopatrywanej struktury. Ilość i rozmieszczenie tych komórek na terenie splotowzwoju mięśniówkowego zmienia się wraz ze wzrostem odległości od odźwiernika. Uzyskane dane neuroanatomiczne istotnie uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat unerwienia zwieracza odźwiernika żołądka świni w stanie fizjologicznym.

2. Do regulacji funkcji zwieracza odźwiernika w stanie fizjologicznym śródściennie neurony zstępujące wykorzystują galaninę, natomiast substancja P nie bierze udziału w tej regulacji. Analiza dostępnej literatury wykazuje, iż wyniki te znacznie różnią się od wyników prezentowanych u zwierząt poligastrycznych.
3. Owrzodzenia dystalnej części żołądka wykazują silnie destrukcyjny wpływ na śródściennie projekcje nerwowe zaopatrujące mięsień zwieracz odźwiernika zmieniając zasięg tych projekcji oraz rozmieszczenie i ilość neuronów w nią zaangażowanych. Uzyskane wyniki neuroanatomiczne sugerują istnienie przyczyn neurogennych w symptomie utrudnionego opróżniania żołądka obserwowanym u pacjentów z owrzodzeniami części odźwiernikowej narządu.
4. Śródściennie zstępujące neurony żołądkowe zaopatrujące zwieracz odźwiernika żołądka świni w przebiegu owrzodzeń dystalnej części żołądka nie zmieniają w sposób istotny statystycznie ekspresji galaniny ani substancji P. Uzyskany wynik wyklucza udział badanych neuropeptydów w zjawisku plastyczności neuronalnej tych komórek. Zestawienie otrzymanego wyniku z danymi wykazującymi zmiany ekspresji galaniny i substancji P w przebiegu różnych procesów patologicznych uwidacznia istnienie precyzyjnej kontroli mechanizmu plastyczności neuronalnej w różnych grupach neuronów.
5. Ekspresja galaniny i substancji P w populacji komórek enterycznego układu nerwowego żołądka świń zdrowych wykazuje znaczne rozbieżności pomiędzy różnymi częściami badanego narządu. Różnice ilościowe występują również pomiędzy populacją neuronów podśluzówkowych i mięśniówkowych immunoreaktywnych dla danego neuropeptydu na terenie tych samych części żołądka. Zaobserwowane rozbieżności wydają się ściśle korelować z funkcjami regulacyjnymi pełnionymi przez badane neuropeptydy i potwierdzają wysoką specjalizację enterycznego układu nerwowego w różnych częściach ściany tego samego narządu. Analiza danych literaturowych dowodzi istnienia pewnych podobieństw do danych prezentowanych w żołądku człowieka, i rozbieżności względem unerwienia żołądka gryzoni co naświetla przydatność żołądka świni do wykorzystania w eksperymentach biomedycznych.
6. Ogniskowe wrzody występujące w dystalnej części żołądka w istotny sposób wpływają na zmianę sposobu kodowania chemicznego śródściennych neuronów zlokalizowanych w tkankach bezpośrednio graniczących z owrzodzeniem, jak również neuronów oddalonych od tego ogniska i występujących bardziej proksymalnych (trzon żołądka) i dystalnych (ujście odźwiernika) częściach narządu. Uzyskane dane jednoznacznie wykazują udział galaniny i

substancji P w procesie plastyczności neuronalnej perykarionów enterycznego układu nerwowego rozproszonych na dużym obszarze ściany żołądka. Subtelne różnice w zmianach ekspresji badanych neuropeptydów obserwowane między różnymi grupami neuronów uwidaczniają wysoką precyzję regulacji tych mechanizmów.

7. Ekspresja genów kodujących badane neuropeptydy oraz ich receptory ulega precyzyjnym zmianom w tkankach żołądka bezpośrednio graniczących z owrzodzeniem, jak również w tkankach oddalonych od ogniska zapalnego. Różnice w ekspresji genów kodujących badane receptory potwierdzają istnienie dodatkowego piętra regulacyjnego umożliwiającego precyzyjną modulację odpowiedzi tkanek żołądka na neuropeptydy uwalniane w przebiegu owrzodzenia.

Biorąc pod uwagę znaczenie badanego gatunku w gospodarce rolnej i medycynie weterynaryjnej oraz możliwość wykorzystania go jako organizmu modelowego w badaniach biomedycznych przedstawione w niniejszej dysertacji wyniki neuroanatomiczne wydają się mieć szczególnie istotne znaczenie umożliwiając prowadzenie dalszych eksperymentów przez inne dziedziny nauki. Przyszłe badania weryfikując możliwość zastosowania agonistów bądź antagonistów receptorów dla badanych neuropeptydów mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii schorzeń żołądka ludzi i zwierząt. W tym kontekście szczególnej wymowy nabierają wyniki eksperymentów wykazujących ograniczenie powstawania owrzodzeń śluzówki żołądka oraz hamowanie odpowiedzi zapalnej okrężnicy szczura w następstwie podawania galaniny (99), czy też eksperymenty wykazujące znaczącą poprawę stanu klinicznego w przebiegu zapaleniu jelita czczego myszy po zahamowaniu syntezy/uwalniania substancji P (100). Co więcej, w obecnej medycynie już znalazły efektywne zastosowanie leki w których aktywną substancję stanowią antagoniści receptorów tachykininowych (jako leki przeciwwymiotne) (101), urealniając hipotezę przedstawioną powyżej.

4.5 Piśmiennictwo

- (1) Hughson W. Reflex spasm of the pylorus and its relation to diseases of the digestive organs. Archives of Surgery 1925; 11:136-151.
- (2) Horton T. Pyloric musculature, with special reference to pyloric block. Developmental Dynamics 1928; 41(2):197-225.
- (3) Torgersen J. The muscular build and movements of the stomach and duodenal bulb. Acta Radiol Suppl 1942; 45:1.
- (4) Keet AD, Heydenrych JJ. The anatomy and movements of the pyloric sphincteric cylinder. S Afr Med J 1982; 62(1):15-18.

- (5) Keet AD. The anatomical extent of the pyloric sphincteric cylinder, the pyloric mucosal zone and the pyloric antrum. *S Afr Med J* 1982; 62(10):329-333.
- (6) Zalecki M. Localization and neurochemical characteristics of the extrinsic sympathetic neurons projecting to the pylorus in the domestic pig. *J Chem Neuroanat* 2012; 43(1):1-13.
- (7) Zalecki M, Podlasz P, Pidsudko Z, Wojtkiewicz J, Kaleczyc J. Vagal projections to the pylorus in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Auton Neurosci* 2012; 171(1-2):21-27.
- (8) Zalecki M. Extrinsic primary afferent neurons projecting to the pylorus in the domestic pig-- localization and neurochemical characteristics. *J Mol Neurosci* 2014; 52(1):82-89.
- (9) Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41 Suppl 1:S4-S6.
- (10) Lindstrom LM, Ekblad E. Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Auton Neurosci* 2002; 97(2):73-82.
- (11) Ramkumar D, Schulze KS. The pylorus. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17 Suppl 1:22-30.
- (12) Kressel M, Berthoud H-R, Neuhuber WL. Vagal innervation of the rat pylorus: An anterograde tracing study using carbocyanine dyes and laser scanning confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 275, 109-123. 1994.
- (13) Schulze-Delrieu K, Shirazi SS. Neuromuscular differentiation of the human pylorus. *Gastroenterology* 1983; 84:287-292.
- (14) Treacy PJ, Jamieson GG, Dent J, Akkermans LMA, Heddle R, Landers BR. Antro-pyloric pressure and isolated pyloric waves are major regulators of gastric emptying of liquids. *Gastroenterology* 1988; 94:A464.
- (15) Treacy PJ, Jamieson GG, Dent J. Pyloric motor function during emptying of a liquid meal from the stomach in the conscious pig. *J Physiol* 1990; 422:523-538.
- (16) Mazzuoli G, Lucherini MC, Russo D, Clavenzani P, Chiocchetti R. Intrinsic neuronal control of the pyloric sphincter of the lamb. *J Chem Neuroanat* 2008; 36(2):98-106.
- (17) Mearin F, Camilleri M, Malagelada JR. Pyloric dysfunction in diabetics with recurrent nausea and vomiting. *Gastroenterology* 1986; 90(6):1919-1925.
- (18) Fisher RS, Cohen S. Pyloric-sphincter dysfunction in patients with gastric ulcer. *N Engl J Med* 1973; 288(6):273-276.
- (19) Kocak E, Kilic F, Akbal E, Tas A, Koklu S, Filik L et al. The usefulness of ulcer size and location in the differential diagnosis of benign and malignant gastric ulcer. *Wien Klin Wochenschr* 2013; 125(1-2):21-25.
- (20) Xu C, Shen J, Xie S, Jiang Z, Chen W, Wang L. Impact of malignant ulcer size on lymph node stages in gastric cancer with ulcerative growth. *Hepatogastroenterology* 2012; 59(114):612-615.
- (21) Xu CY, Shen JG, Shen JY, Chen WJ, Wang LB. Ulcer size as a novel indicator marker is correlated with prognosis of ulcerative gastric cancer. *Dig Surg* 2009; 26(4):312-316.
- (22) Black RB, Hole D, Rhodes J. Bile damage to the gastric mucosal barrier: the effect of pH and bile acid concentrations. *Gastroenterology* 1971; 61:178-184.

- (23) Bondurant FJ, Maull KI, Nelson HS, Jr., Silver SH. Bile reflux gastritis. *South Med J* 1987; 80(2):161-165.
- (24) Nafstad I, Tollersrud S. Gastric ulcers in swine. 2. Effects of high fat diets and vitamin E on ulcer development. *Pathol Vet* 1967; 4(1):15-22.
- (25) Nafstad I. Gastric ulcers in swine. 1. Effect of dietary protein, dietary fat and vitamin E on ulcer development. *Pathol Vet* 1967; 4(1):1-14.
- (26) Nafstad I, Tollersrud S, Baustad B. Gastric ulcers in swine. 3. Effects of different proteins and fats on their development. *Pathol Vet* 1967; 4(1):23-30.
- (27) Friendship RM. Gastric ulceration in swine. *J Swine Health Prod* 2004; 12(1):34-35.
- (28) Friendship RM. Gastric ulcers. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1999. 685-694.
- (29) Melnichouk SI. Mortality associated with gastric ulceration in swine. *Can Vet J* 2002; 43(3):223-225.
- (30) Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ. Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1988; 1(1):65-79.
- (31) Swindle MM, Moody DC, Philips LD. *Swine as models in biomedical Research*. Ames: Iowa State University Press; 1992.
- (32) Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Jr., Frazier KS. *Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing*. Vet Pathol 2011.
- (33) Swindle MM. The development of swine models in drug discovery and development. *Future Med Chem* 2012; 4(14):1771-1772.
- (34) Patterson JK, Lei XG, Miller DD. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(6):651-664.
- (35) Johnson HD. The classification and principles of treatment of gastric ulcers. *Lancet* 1957; 273(6994):518-520.
- (36) Johnson HD, Love AH, Rogers NC, Wyatt AP. Gastric ulcers, blood groups, and acid secretion. *Gut* 1964; 5:402-411.
- (37) Johnson HD. Gastric ulcer: classification, blood group characteristics, secretion patterns and pathogenesis. *Ann Surg* 1965; 162(6):996-1004.
- (38) Stadelmann O, Elster K, Stolte M, Miederer SE, Deyhle P, Demling L et al. The peptic gastric ulcer--histotopographic and functional investigations. *Scand J Gastroenterol* 1971; 6(7):613-623.
- (39) Brooks FP. The pathophysiology of peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1985; 30(11 Suppl):15S-29S.
- (40) Kanaizumi T, Nakano H, Matsui T, Tatsumi H, Ishikawa H, Kuramoto H et al. Gastric emptying in patients with gastric and duodenal ulcer. *Tohoku J Exp Med* 1989; 158(2):133-140.

- (41) Murray GF, Ballinger WF, Stafford ES. Ulcers of the pyloric channel. *Am J Surg* 1967; 113(2):199-203.
- (42) Texter EC, Jr., Smith HW, Bundesen WE, Barborka CJ. The syndrome pylorique; clinical and physiologic observations. *Gastroenterology* 1959; 36(5):573-579.
- (43) Sharkey KA, Kroese AB. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec* 2001; 262(1):79-90.
- (44) Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1:123-128.
- (45) Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17(1):4-15.
- (46) Lakomy M, Sienkiewicz W, Zmudzki J, Kaleczyc J, Wasowicz K. Changes in the expression of some neuropeptides in the intestines and nerve ganglia during the porcine dysentery. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2005; 49:393-398.
- (47) Kaleczyc J, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Lakomy M. The distribution and chemical coding of intramural neurons supplying the porcine stomach - the study on normal pigs and on animals suffering from swine dysentery. *Anat Histol Embryol* 2007; 36(3):186-193.
- (48) Pidsudko Z, Kaleczyc J, Wasowicz K, Sienkiewicz W, Majewski M, Zajac W et al. Distribution and chemical coding of intramural neurons in the porcine ileum during proliferative enteropathy. *J Comp Pathol* 2008; 138(1):23-31.
- (49) Sienkiewicz W, Wasowicz K, Kaleczyc J, Lakomy M. Neuropeptide-immunoreactive nerve structures in the ileum and large intestine of pigs undergoing dysentery. *Med Weter* 2006; 62:1127-1133.
- (50) Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982; 296(5858):659-660.
- (51) Ekblad E, Rokaeus A, Hakanson R, Sundler F. Galanin nerve fibers in the rat gut: distribution, origin and projections. *Neuroscience* 1985; 16(2):355-363.
- (52) Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A, Fahrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V. Distribution of galanin-like immunoreactivity in the gastro-intestinal tract of several mammalian species. *Cell Tissue Res* 1985; 239(2):253-270.
- (53) Bishop AE, Polak JM, Bauer FE, Christofides ND, Carlei F, Bloom SR. Occurrence and distribution of a newly discovered peptide, galanin, in the mammalian enteric nervous system. *Gut* 1986; 27(7):849-857.
- (54) Feher E, Burnstock G. Galanin-like immunoreactive nerve elements in the small intestine of the rat. An electron microscopic immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1988; 92(2):137-142.
- (55) Wang YF, Mao YK, McDonald TJ, Daniel EE. Distribution of galanin-immunoreactive nerves in the canine gastrointestinal tract. *Peptides* 1995; 16(2):237-247.

- (56) Sternini C, Anselmi L, Guerrini S, Cervio E, Pham T, Balestra B et al. Role of galanin receptor 1 in peristaltic activity in the guinea pig ileum. *Neuroscience* 2004; 125(1):103-112.
- (57) Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(5):G797-G804.
- (58) Matkowskyj KA, Danilkovich A, Marrero J, Savkovic SD, Hecht G, Benya RV. Galanin-1 receptor up-regulation mediates the excess colonic fluid production caused by infection with enteric pathogens. *Nat Med* 2000; 6(9):1048-1051.
- (59) Wang S, Ghibaudi L, Hashemi T, He C, Strader C, Bayne M et al. The GalR2 galanin receptor mediates galanin-induced jejunal contraction, but not feeding behavior, in the rat: differentiation of central and peripheral effects of receptor subtype activation. *FEBS Lett* 1998; 434(3):277-282.
- (60) Anselmi L, Lakhter A, Hirano AA, Tonini M, Sternini C. Expression of galanin receptor messenger RNAs in different regions of the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2005; 26(5):815-819.
- (61) Waters SM, Krause JE. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 2000; 95(1):265-271.
- (62) Lang R, Gundlach AL, Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol Ther* 2007; 115(2):177-207.
- (63) Lang R, Kofler B. The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides* 2011; 45(1):1-8.
- (64) O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201(2):167-180.
- (65) Mantyh CR, Pappas TN, Lapp JA, Washington MK, Neville LM, Ghilardi JR et al. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. *Gastroenterology* 1996; 111(5):1272-1280.
- (66) Mantyh CR, Maggio JE, Mantyh PW, Vigna SR, Pappas TN. Increased substance P receptor expression by blood vessels and lymphoid aggregates in *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41(3):614-620.
- (67) Mantyh PW. Substance P and the inflammatory and immune response. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 632:263-271.
- (68) Erin N, Turker S, Elpek O, Yildirim B. Differential changes in Substance P, VIP as well as neuropeptide Y levels in patients with gastritis or ulcer. *Peptides* 2012; 35(2):218-224.
- (69) Palmer JM, Wong-Riley M, Sharkey KA. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1):G922-G935.
- (70) Furness JB. *The Enteric Nervous System*. Oxford: Blackwell; 2006.

- (71) Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817:39-71.
- (72) Schemann M, Reiche D, Michel K. Enteric pathways in the stomach. *Anat Rec* 2001; 262(1):47-57.
- (73) Sobreira LF, Zucoloto S, Garcia SB, Troncon LE. Effects of myenteric denervation on gastric epithelial cells and gastric emptying. *Dig Dis Sci* 2002; 47(11):2493-2499.
- (74) Mochiki E, Kuwano H, Nakabayashi T, Garcia M, Haga N, Asao T. Pyloric relaxation regulated via intramural neural pathway of the antrum. *Dig Dis Sci* 2001; 46(11):2307-2313.
- (75) Allescher HD, Daniel EE, Dent J, Fox JE, Kostolanska F. Extrinsic and intrinsic neural control of pyloric sphincter pressure in the dog. *J Physiol* 1988; 401:17-38.
- (76) Anvari M, Yu P, Dent J, Jamieson GG. Role of antral intramural neural pathways in control of gastric emptying in the pig. *J Physiol* 1995; 488 (Pt 1):203-209.
- (77) Furness JB, Bornstein JC, Smith TK, Murphy R, Pompolo S. Correlated functional and structural analysis of enteric neural circuits. *Arch Histol Cytol* 1989; 52 Suppl:161-166.
- (78) Anselmi L, Stella SL, Jr., Brecha NC, Sternini C. Galanin inhibition of voltage-dependent Ca(2+) influx in rat cultured myenteric neurons is mediated by galanin receptor 1. *J Neurosci Res* 2009; 87(5):1107-1114.
- (79) Schmidt PT, Holst JJ. Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(4):579-588.
- (80) Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(8):1321-1341.
- (81) Liebermann-Meffert D, Muller C, Allgower M. Gastric hypermotility and antropyloric dysfunction in gastric ulcer patients. *Br J Surg* 1982; 69(1):11-13.
- (82) Garret JM, Summerskill WHJ, Code CF. Antral motility in patients with gastric ulcer. *Amer J Dig Dis* 1966; 11:780-789.
- (83) Liebermann-Meffert D, Allgower M. Neuromuscular tissue defects and antropyloric dysfunction in peptic ulcer. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1981; 67:111-113.
- (84) Liebermann-Meffert D, Allgower M. The morphology of the antrum and pylorus in gastric ulcer disease. *Prog Surg* 1977; 15:109-139.
- (85) Soldani G, Mengozzi G, Della LA, Intorre L, Martelli F, Brown DR. An analysis of the effects of galanin on gastric acid secretion and plasma levels of gastrin in the dog. *Eur J Pharmacol* 1988; 154(3):313-318.
- (86) Lordal M, Hallgren A, Nylander O, Hellstrom PM. Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol Scand* 1996; 156(4):489-494.
- (87) Ferri GL, Adrian TE, Soimero L, Blank M, Cavalli D, Biliotti G et al. Intramural distribution of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P, somatostatin and mammalian bombesin in the oesophago-gastro-pyloric region of the human gut. *Cell Tissue Res* 1989; 256(1):191-197.

- (88) Rothstein RD, Johnson E, Ouyang A. Distribution and density of substance P receptors in the feline gastrointestinal tract using autoradiography. *Gastroenterology* 1991; 100(6):1576-1581.
- (89) Czaja K, Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Lakomy M. The influence of experimental ileitis on the neuropeptide coding of enteric neurons in the pig. *Pol J Vet Sci* 2005; 8(2):155-163.
- (90) Kaleczyc J, Podlasz P, Winnicka A, Wasowicz W, Sienkiewicz W, Zmudzki J et al. Characterization of autonomic nerve markers and lymphocyte subsets in the ileal Peyer's patch of pigs infected experimentally with *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Comp Pathol* 2010; 143(4):248-257.
- (91) Wasowicz K, Podlasz P, Chmielewska M, Losiewicz K, Kaleczyc J, Zmudzki J et al. Changes in the expression of galanin and galanin receptors in the wall of the colon in pigs experimentally infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2014; 58(1):23-28.
- (92) Swain MG, Agro A, Blennerhassett P, Stanis A, Collins SM. Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 1992; 102(6):1913-1919.
- (93) Mantyh CR, Vigna SR, Bollinger RR, Mantyh PW, Maggio JE, Pappas TN. Differential expression of substance P receptors in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1995; 109(3):850-860.
- (94) Mantyh PW, Catton MD, Boehmer CG, Welton ML, Passaro EP, Jr., Maggio JE et al. Receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory diseases: implications for the effector role of sensory neurons. *Peptides* 1989; 10(3):627-645.
- (95) Mantyh CR, Vigna SR, Maggio JE, Mantyh PW, Bollinger RR, Pappas TN. Substance P binding sites on intestinal lymphoid aggregates and blood vessels in inflammatory bowel disease correspond to authentic NK-1 receptors. *Neurosci Lett* 1994; 178(2):255-259.
- (96) Lu X, Bartfai T. Analyzing the validity of GalR1 and GalR2 antibodies using knockout mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2009; 379(4):417-420.
- (97) Steinhoff MS, von MB, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* 2014; 94(1):265-301.
- (98) McDonald AC, Schuijers JA, Gundlach AL, Grills BL. Galanin treatment offsets the inhibition of bone formation and downregulates the increase in mouse calvarial expression of TNF α and GalR2 mRNA induced by chronic daily injections of an injurious vehicle. *Bone* 2007; 40(4):895-903.
- (99) Talero E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, Motilva V. Chronic administration of galanin attenuates the TNBS-induced colitis in rats. *Regul Pept* 2007; 141(1-3):96-104.
- (100) Agro A, Stanis AM. Inhibition of murine intestinal inflammation by anti-substance P antibody. *Reg Immunol* 1993; 5(2):120-126.
- (101) Quartara L, Altamura M. Tachykinin receptors antagonists: from research to clinic. *Curr Drug Targets* 2006; 7(8):975-992.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych z informacją o zdobytych finansowaniach, odbytych stażach w zagranicznych ośrodkach naukowych lub akademickich.

5.1 Badania których wyniki zostały opublikowane w czasopismach naukowych

W prowadzonych przeze mnie badaniach można wyróżnić następujące obszary zainteresowań:

1. Badania dotyczące neuroanatomicznej organizacji struktur centralnego układu nerwowego
2. Badania obejmujące szeroko rozumianą charakterystykę struktur układu rozrodczego i jego unerwiania w stanie fizjologicznym i w wybranych stanach patologicznych.
3. Badania dotyczące unerwienia układu pokarmowego w stanie fizjologicznym i w przebiegu eksperymentalnie wywoływanych stanów patologicznych. W tej grupie można wyodrębnić eksperymenty podejmujące tematykę:
 - a. zewnątrzpochodnych źródeł unerwienia
 - b. śródsściennego (enterycznego) układu nerwowego

5.1.1 Badania z zakresu neuroanatomicznej organizacji struktur centralnego układu nerwowego

Prowadzone eksperymenty obejmowały tematy związane z lokalizacją i określeniem właściwości neurochemicznych wybranych struktur nerwowych występujących na terenie rdzenia kręgowego i tyłomózgowia świni domowej. W większości przeprowadzonych eksperymentów byłem bezpośrednio zaangażowany w koncepcję i projekt badań oraz odpowiadałem za wykonywanie części laboratoryjnej, analizę mikroskopową, opis uzyskanych wyników, wykonanie stosownej dokumentacji jak również uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptów. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach (krótki opis prowadzonych badań umieszczony jest poniżej danych bibliograficznych każdej pracy):

5.1.1.1

Distribution and morphology of NOS-immunoreactive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig. Calka J., Załęcki M., Wasowicz K., Lakomy M.; Med Wet. 2006; 62(10):1134-1138 (IF=0,259 ; MNiSW=9 pkt)

Tlenek azotu, neuroprzebiegacznik o charakterystycznych właściwościach, który nie jest gromadzony w pęcherzykach synaptycznych, a dyfundując do przyległych tkanek oddziałuje na sąsiednie neurony jest tworzony w komórkach przez specyficzny enzym – syntetaza tlenku azotu (NOS). W przeprowadzonych badaniach obecność neuronalnej izoformy syntetazy tlenku azotu została uwidoczniła na terenie

rdzenia kręgowego świni w strukturach nerwowych związanych z przekaźnictwem impulsów czuciowych (rogi dogrzbietowe) i układem autonomicznym (istota pośrednia – jądro pośrednioboczne i pośrednioprzyśrodkowe). Co ciekawe, komórki wyścielające kanał środkowy rdzenia kręgowego również wykazywały immunoreaktywność dla tej izoformy NOS, co wskazuje na możliwość bezpośredniego uwalniania tlenu azotu do płynu mózgowo-rdzeniowego.

5.1.1.2

*A comparison of the distribution and morphology of ChAT-, VACHT-immunoreactive and AChE-positive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig. Calka J., **Zalecki M.**, Wasowicz K., Arciszewski M., Lakomy M.; Veterinarni Medicina 2008; 53(8): 434-444 (IF=0,659; MNiSW=27 pkt)*

Neurony cholinergiczne stanowią jedną z głównych populacji nerwowych na terenie centralnego i obwodowego układu nerwowego. Do markerów neuronów cholinergicznych należy enzym acetylotransferaza cholinowa (ChAT) oraz pęcherzykowy transporter acetylocholin (VACHT), natomiast enzymem rozkładającym/degradowującym acetylocholinę jest acetylocholinoesteraza (AChE). Wykorzystując kombinację technik histochemicznych i immunohistochemicznych wykonana została analiza porównawcza obecności nerwowych struktur zawierających poszczególne markery na terenie rdzenia kręgowego świni. W eksperymencie wykazano obecność neuronów cholinergicznych w strukturach nerwowych istoty szarej związanych z przekaźnictwem impulsów ruchowych (rogi brzuszne) i autonomicznych (istota pośrednia – jądro pośrednio-boczne i pośrednio-przyśrodkowe). Interesującą obserwacją był fakt, iż występowanie markerów AChE i ChAT nie korelowało w perykarionach jądra pośrednio-przyśrodkowego, co wskazuje na istnienie złożonych zależności występujących między tymi enzymami na terenie układu autonomicznego.

5.1.1.3

*Co-localisation of NOS- and ChAT-immunoreactivity in the spinal autonomic nuclei of the pig. An immunocytochemical study. Calka J., **Zalecki M.**, Arciszewski M.; Bull Vet Inst Pulawy 2008; 52:635-641 (IF=0,337; MNiSW=20 pkt)*

W oparciu o wyniki uzyskane w poprzednich badaniach przeprowadzone zostało doświadczenie w którym wykorzystując technikę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych określono współwystępowanie markerów cholinergicznych i nitrergiczych w perykarionach znajdujących się na terenie jąder autonomicznych rdzenia kręgowego świni. Przeprowadzony eksperyment wykazał występowanie populacji neuronów współzawierających obydwa markery, jak również komórek wykazujących obecność tylko jednego z badanych markerów. Uzyskane dane dostarczyły morfologicznych dowodów na współdziałanie tlenu azotu i acetylocholin w regulacji rdzeniowych neuronów autonomicznych.

5.1.1.4

Evidence for coexistence of choline acetyltransferase (ChAT)- and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactivity In the thoracolumbar and sacra spinal cord neurons of the pig. Calka J., Franke-Radowiecka A., Zalecki M., Lakomy M.; Pol J Vet Sci. 2009; 12(1):61-67 (IF=0,435; MNiSW=20 pkt)

Peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP), uważany za jeden ze specyficznych markerów neuronów czuciowych, według niektórych autorów może być również zaangażowany w przekazywanie impulsów ruchowych i autonomicznych. W przeprowadzonym eksperymencie, wykorzystując technikę podwójnych barwień immunohistochemicznych, wykazano występowanie neuronów CGRP-immunoreaktywnych w strukturach nerwowych istoty szarej rdzenia kręgowego świni związanych z przekazywaniem impulsów czuciowych (rogi dorzbiecowe), autonomicznych (istota pośrednia – jądro pośrednio-boczne i pośrednio-przyśrodkowe) oraz na terenie jąder ruchowych (rogi brzuszne). W wielu perykarionach immunoreaktywność CGRP współwystępowała z immunoreaktywnością dla ChAT. Uzyskane dane jednoznacznie wskazują na udział badanego peptydu w przekazywaniu impulsów ruchowych i autonomicznych.

5.1.1.5

Organization of Acetylcholine Containing Structures in the Cranial Motor Nuclei of the rhombencephalon of the pig. Zalecki M., Calka J., Lakomy M.; Veterinarni Medicina. 2007; 52(7): 293-300 (IF=0,645; MNiSW=27 pkt)

Celem prowadzonych badań było scharakteryzowanie cholinergiczných struktur nerwowych w jądrach mózgowych nerwów czaszkowych zlokalizowanych na terenie tyłomózgowia świni. Zastosowano technikę barwień immunohistochemicznych na mrożeniowych skrawkach tyłomózgowia świni. Eksperyment oprócz uwidocznienia neuronów cholinergiczných ujawnił występowanie immunoreaktywnych koszykowatych struktur nerwowych (z j. angielskiego „buton-like structures”) bezpośrednio kontaktujących się z neuronami. Obserwowane struktury najprawdopodobniej stanowią zakończenia synaptyczne wypełnione acetylocholiną. W eksperymencie wykazano, iż perykariony jądra grzbiecowego nerwu błędnego (należącego do układu autonomicznego) nie posiadały tego typu struktur, co w znaczący sposób odróżniało je od neuronów zlokalizowanych w pozostałych jądrach nerwów czaszkowych.

5.1.1.6

Re-examination of the topographical localization of facial nucleus in the pig. Calka J., Zalecki M., Wasowicz K., Bukowski R., Lakomy M.; Anat Embryol (Berl). 2006; 211(3):197-201 (IF=1,277; MNiSW=20 pkt)

Mikroskopowe obserwacje preparatów zawierających rdzeń przedłużony świni domowej barwionych różnymi technikami histochemicznymi oraz analiza porównawcza dostępnych atlasów neuroanatomicznych różnych zwierząt wykazały istnienie znaczących różnic między obserwowanymi strukturami (m.in. lokalizacja jądra ruchowego nerwu twarzowego), a danymi prezentowanymi w atlasie poświęconemu neuroanatomicznej budowie mózgowia świni. Celem wyjaśnienia zaobserwowanych różnic wykonany został eksperyment w którym przy użyciu znacznika neuronalnego Fast-Blue wyznakowane zostały neurony jądra nerwu twarzowego. Badania ujawniły właściwą lokalizację jądra nerwu twarzowego, która znacząco różniła się od danych przedstawionych w w/w atlasie neuroanatomicznym dotyczącym świni.

5.1.1.7

Morfologiczne uwarunkowania zjawiska neurosekrecji w wyniosłości pośrodkowej. Calka J., Zalecki M., Calka M.; Szkice Humanistyczne. 2006; T.VI: 301-308 (Lista B, MNiSW=6pkt)

Przeglądowy artykuł w którym opisane zostało zjawisko neurosekrecji w przysadce mózgowej.

5.1.1.8

Gdy rozum śpi, łączą się neurony. Calka J., Zalecki M.; Wiedza i Życie 2007; 5:60-61

Artykuł popularnonaukowy opisujący wybrane aspekty funkcjonowania mózgu.

5.1.2 Badania obejmujące szeroko rozumianą charakterystykę struktur układu rozrodczego i jego unerwiania w stanie fizjologicznym i w wybranych procesach patologicznych.

Prowadzone eksperymenty nacełowane były na weryfikację występowania różnych substancji biologicznie czynnych i białek w strukturach należących lub bezpośrednio związanych z układem rozrodczym. W badaniach wykorzystywano między innymi technikę podwójnych barwień immunohistochemicznych i mikroskopię konfokalną. W większości prowadzonych eksperymentów bezpośrednio uczestniczyłem w przygotowaniu materiału do analiz, wykonywaniu badań laboratoryjnych, mikroskopii konfokalnej, analizie i opracowywaniu

uzyskanych danych. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach (krótki opis prowadzonych badań umieszczony jest poniżej danych bibliograficznych każdej pracy):

5.1.2.1

Innervation pattern of polycystic ovaries in the women. Wojtkiewicz J., Jana B., Kozłowska A., Crayton R., Majewski M., Zalecki M., Baranowski W., Radziszewski P.; J Chem Neuroanat. 2014; 61-62:147-52 (IF= 1,5; MNiSW=20 pkt)

Na podstawie doniesień literaturowych sugerujących udział układu nerwowego w patogenezie i przebiegu schorzeń określanych jako zespół policystycznych jajników kobiet, przeprowadzono eksperyment w którym przy wykorzystaniu technik barwień immunohistochemicznych wykazano istnienie znaczących różnic w unerwieniu jajnika kobiet z rozpoznaną w/w jednostką chorobową (zmiany dotyczyły liczebności włókien immunoreaktywnych dla różnych neuroprzekazników). Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze hipotezy o zaangażowaniu układu nerwowego w przebieg tego zespołu chorobowego.

5.1.2.2

Nitric oxide in the bovine oviduct: Influence on contractile activity and nitric oxide synthase isoforms localization. Yilmaz O., Calka J., Bukowski R., Zalecki M., Wasowicz K., Jaroszewski J., Markiewicz W., Bulbul A., Ucar M.; Theriogenology. 2012; 77(7):1312-27 (IF=2,082; MNiSW=35 pkt)

Tlenek azotu produkowany z L-argininy przez różne typy syntazy tlenu azotu (nNOS, iNOS, eNOS) jest uważany za jedną z kluczowych substancji regulujących prawidłowe funkcjonowanie ściany jajowodu. W przeprowadzonym eksperymencie wykazano występowanie różnych izoform syntazy tlenu azotu na terenie jajowodu (cieśń, lejek) krowy oraz wykluczono bezpośredni wpływ tego gazu na kurczliwość mięśniówki jajowodu. Co istotne, uzyskiwane wyniki były ściśle uzależnione od fazy cyklu rujowego z którego pochodziły badane próby wskazując na istotne różnice nitrergicznego regulacji pracy jajowodu w zależności od fazy cyklu.

5.1.2.3

Effect of seminal plasma zinc-binding proteins on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. Mogielnicka-Brzozowska M., Dziekonska A., Strzeżek R., Zalecki M., Majewska A., Tolscik K., Kordan W.; Bull Vet Inst Pulawy 2014; 58:163-168 (IF=0,357; MNiSW=15 pkt)

Jony cynku odgrywają kluczową rolę w procesie spermatogenezy, jak również wpływają na zachowanie właściwych paramentów nasienia. W przeprowadzonym eksperymencie przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej uwidoczniono dokładną lokalizację białek wiążących cynk na plemnikach

zawartych w ejakulacie psa. Badania wykazały również protekcyjne działanie suplementacji tych białek na parametry nasienia poddanego działaniu niskich temperatur (kriokonserwacja). Działanie protekcyjne badanych białek jest oparte na zabezpieczeniu odpowiedniego stężenia i dostępności jonów cynku.

5.1.2.4

*Immunohistochemical Characterization of Sympathetic Chain Ganglia (SChG) Neurons Supplying the Porcine mammary Gland. Franke-Radowiecka A., Wasowicz K., Klimczuk M., Podlasz P., **Zalecki M.**, Sienkiewicz W. - Anat Histol Embryol.; 2016; 45(1):44-50 (IF=0,683; MNiSW=20 pkt)*

Unerwienie współczulne gruczołu mlekowego jest jednym z głównych czynników regulujących proces wydzielania mleka u ssaków. Wykorzystując kombinację techniki wstecznego znakowania neuronów z techniką podwójnych barwień immunohistochemicznych precyzyjnie zlokalizowano źródła współczulnego unerwienia gruczołu mlekowego świni domowej oraz określono wzór kodowania chemicznego tych neuronów. Dowiedziono, iż badane neurony współczulne oprócz enzymów szlaku katecholaminergicznego wykazywały również immunoreaktywność dla somatostatyny (SOM), neuropeptydu Y (NPY), a także wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP).

5.1.2.5

*Morphological and neuroanatomical study of the mammary gland in the immature and mature European beaver (Castor fiber). Franke-Radowiecka A., Gizejewski Z., Klimczuk M., Dudek A., **Zalecki M.**, Jurczak A., Kaleczyc J.; Tissue Cell. 2016; 48(5):552-7 (IF=1,232; MNiSW=20 pkt)*

Ograniczony dostęp do materiału pochodzącego od gatunków zwierząt chronionych, do jakich należy bóbr europejski, znacząco zmniejsza liczbę danych literaturowych opisujących morfologię i organizację neuroanatomiczną struktur anatomicznych u tych ssaków. Wykorzystując tkanki pochodzące od zwierząt wylapywanych podczas odłowów interwencyjnych przeprowadzono badania w wyniku których opisano budowę morfologiczną gruczołu mlekowego samic niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Ponadto, wykorzystując technikę podwójnych barwień immunohistochemicznych i mikroskopię konfokalną wykazano istnienie dużej liczby włókien nerwowych zawierających różne neurotransmitery zlokalizowanych na terenie brodawki gruczołu i w samej tkance gruczołowej.

5.1.3 Badania dotyczące unerwienia układu pokarmowego w stanie fizjologicznym i w przebiegu eksperymentalnie wywoływanych stanów patologicznych

Jest to mój główny kierunek badawczy. Prowadzone badania dotyczyły głównie unerwienia układu pokarmowego świni domowej, choć niektóre eksperymenty przeprowadzałem również na tkankach innych ssaków. Pragnę tu zaznaczyć, iż wybór świni domowej jako zwierzęcia eksperymentalnego nie był przypadkowy. Jak opisałem wcześniej gatunek ten wydaje się mieć szczególnie istotne znaczenia dla medycyny weterynaryjnej, ale także dla badań biomedycznych. Problemy związane z układem pokarmowym świń stanowią dużą grupę schorzeń które oprócz problemów czysto leczniczych, przyczyniają się również do znaczących strat ekonomicznych. Z drugiej strony, organizm świni domowej, będącej zwierzęciem wszystkożernym, jest przez wielu badaczy uważany za szczególnie dobry organizm modelowy do badań prowadzonych nad jednostkami chorobowymi człowieka. Stąd uzyskane wyniki z zakresu nauk podstawowych, mogą zostać wykorzystane przez inne obszary nauki do prowadzenia dalszych badań.

W większości opisanych eksperymentów byłem bezpośrednio zaangażowany w tworzenie koncepcji badań i bezpośrednio uczestniczyłem we wszystkich etapach prowadzonych doświadczeń (poczynając od wprowadzenia zwierząt doświadczalnych, przez wykonywanie zabiegów eksperymentalnych, opiekę nad zwierzętami, pobieranie materiału, przeprowadzanie badań laboratoryjnych, analizy wyników, wykonywanie dokumentacji, przygotowanie manuskryptów i sam proces publikowania artykułów w czasopismach naukowych).

Prowadzone badania ukierunkowane były na charakterystykę struktur nerwowych zaopatrujących przewód pokarmowy których źródła pochodzą z odległych ośrodków neuronalnych jak również elementów zlokalizowanych w ścianie przewodu pokarmowego. Wybrane eksperymenty nacelowane były również na morfologiczne dowody interakcji struktur nerwowych z elementami układu immunologicznego.

W tematyce prowadzonych badań można wyróżnić dwa główne obszary zainteresowań wynikające z różnej lokalizacji neuronów zaopatrujących układ pokarmowy:

- a. eksperymenty nacelowane na zewnątrzpochodne źródła unerwieniu przewodu pokarmowego
- b. doświadczenia ukierunkowane na śródściennie unerwienie przewodu pokarmowego (enteryczny układ jelitowy)

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach (krótki opis prowadzonych badań umieszczony jest poniżej danych bibliograficznych każdej pracy):

5.1.3.a Unerwienie zewnątrzpochodne

5.1.3.a.1

*Localization and neurochemical characteristics of the extrinsic sympathetic neurons projecting to the pylorus in the domestic pig. **Zalecki M.**; J Chem Neuroanat. 2012; 43(1):1-13 (IF=2,475; MNiSW=20 pkt)*

Zewnątrzpochodne unerwienie współczulne stanowiące istotny element hamujący motorykę układu pokarmowego, może wykazywać działanie aktywujące mięśniówkę zwieracza odźwiernika żołądka. Zazwojowe neurony układu współczulnego zaopatrujące przewód pokarmowy zawierają różne neurotransmitery i zlokalizowane są w zwojach przy- oraz przedkręgowych. W przeprowadzonym eksperymencie stosując technikę wstecznego znakowania neuronów precyzyjnie określono lokalizację perykarionów układu współczulnego zaopatrujących odźwiernik świni domowej. Co ciekawe, wszystkie neurony zlokalizowane były jedynie w obrębie kompleksu zwoju trzewnego i kręzkowego przedniego (ok. 90% komórek zlokalizowanych było na terenie zwoju trzewnego, 10% w obszarze zwojów kręzkowych przednich). Stosując metodę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych oraz technikę RT-PCR określono profil neurochemiczny badanych neuronów.

5.1.3.a.2

*Vagal projections to the pylorus in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). **Zalecki M.**, Podlasz P., Pidsudko Z., Wojtkiewicz J., Kaleczyc J.; Auton Neurosci. 2012; 171(1-2):21-7 (IF = 1,846; MNiSW=20 pkt)*

Nerw błędny, stanowiący główne źródło unerwienia parasympatycznego i czuciowego większości odcinków układu pokarmowego, dociera do odźwiernika głównie gałęzią żołądkową i wątrobową, które swe źródła w większości czerpią z lewego pnia tego nerwu. Przy wykorzystaniu techniki wstecznego znakowania neuronów została precyzyjnie określona lokalizacja perykarionów nerwu błędnego (unerwienie autonomiczne i czuciowe) zaopatrujących odźwiernik świni domowej. Wyznakowane komórki występowały na terenie obustronnych jąder grzbietowych nerwu błędnego (komponenta autonomiczna) oraz na w obustronnych zwojach dalszych (węzłowych) nerwu błędnego. Choć nie zaobserwowano somatotropowego ułożenia komórek w obszarze badanych struktur, to na uwagę zasługuje fakt, iż nieznacznie większa liczba wyznakowanych komórek zlokalizowana była w strukturach znajdujących się po lewej stronie.

Należy nadmienić, że artykuł został uhonorowany przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych Wyróżnieniem Roku 2012.

5.1.3.a.3

Axotomy-Induced Changes in the Chemical Coding Pattern of Colon Projecting Calbindin-Positive Neurons in the Inferior Mesenteric Ganglia of the Pig. Wojtkiewicz J., Równiak M., Crayton R., Gonkowski S., Robak A., **Zalecki M.**, Majewski M., Klimaschewski L.; *J Mol Neurosci.* 2013; 51(1):99-108 (IF= 2,757; MNiSW=20 pkt)

Uszkodzenie obwodowych włókien nerwowych, które może powstać w następstwie przeprowadzonego zabiegu operacyjnego, skutkuje napływem jonów wapnia do komórki nerwowej, a także wywołuje zmiany w kodowaniu chemicznym uszkodzonych neuronów. Kalbindyna wiążąc jony wapnia w komórce działa protekcyjnie na uszkodzony neuron. Wykorzystując kombinację techniki wstecznego znakowania neuronów, podwójnych barwień immunohistochemicznych oraz przeprowadzając eksperymentalną aksotomię, w zrealizowanym badaniu wykazano, iż przecięcie nerwów zaopatrujących okrężnicę zstępującą świni istotnie wpływa na zmianę kodowania chemicznego zazwojowych neuronów układu współczulnego zaopatrujących badany fragment jelita, jednak nie zmienia ekspresji kalbindyny w tych neuronach.

5.1.3.a.4

Extrinsic Primary Afferent Neurons Projecting to the Pylorus in the Domestic Pig-Localization and Neurochemical Characteristics. **Zalecki M.**; *J Mol Neurosci.* 2014; 52(1):82-9; Epub 2013 (IF= 2,757; MNiSW=20 pkt)

Neurony aferentne poza przekaznictwem impulsów czuciowych do wyższych pięter układu nerwowego mają zdolność uwalniania substancji biologicznie czynnych bezpośrednio do tkanek które unerwiają (z zakończeń obwodowych – na drodze antydromowej). Stosując kombinację technik wstecznego znakowania neuronów oraz podwójnych barwień immunohistochemicznych wykazano, iż ok 80% neuronów czuciowych zaopatrujących odźwiernik świni zlokalizowanych jest w obustronnych zwojach dalszych (węzłowych) nerwu błędnego, a ok. 20% tych neuronów w obustronnych zwojach rdzeniowych neuromerów Th4 - L1. Wyznakowane neurony wykazywały immunoreaktywność (w różnym procencie) dla substancji P (SP), peptydu kodowanego genem kalcytoniny (CGRP), neuronalnej izoformy syntazy tlenu azotu (nNOS) oraz galaniny (Gal). Co ciekawe, obserwowana proporcja liczebności komórek SP-immunoreaktywnych zlokalizowanych w zwojach rdzeniowych w stosunku do zwojów węzłowych była zupełnie odwrotna niż w wynikach uzyskiwanych w badaniach nad unerwieniem żołądka gryzoni.

5.1.3.b Unerwienie śródścienne – enteryczny układ nerwowy

5.1.3.b.1

*Changes in the expression of galanin and galanin receptors in the wall of the colon in pigs experimentally infected with Brachyspira hyodysenteriae. Wasowicz K., Podlasz P., Chmielewska M., Losiewicz K., Kaleczyc J., Zmudzki J., **Zalecki M.**, Pidsudko Z., Lakomy M.; Bull Vet Inst Pulawy; 2014; 58:23-28 (IF=0,357; MNiSW=15 pkt)*

W przebiegu stanów chorobowych przewodu pokarmowego ludzi oraz zwierząt obserwowane są zmiany ekspresji neuropeptydów związanych z toczącym się procesem zapalnym. W przeprowadzonym eksperymencie zweryfikowano względną zmianę ekspresji mRNA dla genów kodujących galaninę i jej receptory (GalR1, GalR2, GalR3) w ścianie okrężnicy zstępującej świń eksperymentalnie zakażanych bakteriami *Brachyspira Hyodysenterie*. Celem dokładniejszej lokalizacji obserwowanych zmian w ścianie jelita, ilość mRNA kodującego badane geny została określona oddzielnie w błonie śluzowej i podśluzowej, błonie mięśniowej a także w limfocytach izolowanych z błony śluzowej. Eksperyment wykazał obecność mRNA dla badanych genów we wszystkich analizowanych strukturach. Co bardzo interesujące, w tkankach zwierząt chorych ekspresja mRNA (dla wszystkich badanych genów) uległa istotnemu zmniejszeniu. Zmiana była szczególnie znacząca w przypadku limfocytów oraz błony śluzowej i podśluzowej. Uzyskane wyniki sugerują, że komórki układu immunologicznego stanowią ważne źródło ekspresji badanych genów w błonie śluzowej i podśluzowej jelit, a dezynteria istotnie zmniejsza ekspresję tych genów w ścianie okrężnicy objętej procesem chorobowym.

5.1.3.b.2

*Changes in the tissue concentration of several neuropeptides in the porcine intestines and intestine-innervating ganglia in the course of porcine proliferative enteropathy. Pidsudko Z., Kaleczyc J., Żmudzki J., Sienkiewicz W., **Zalecki M.**, Klimczuk M., Wasowicz K.; Veterinární medicína 2018; 63:210-215 (IF=0,434; MNiSW=25 pkt)*

Enteropatia proliferacyjna świń wywoływana przez bakterię *Lawsonia intracellularis* jest szeroko rozpowszechnioną jednostką chorobową powodującą znaczące straty ekonomiczne. W przeprowadzonym eksperymencie wykazano istotny wzrost koncentracji wybranych neuropeptydów (galanina, somatostatyna, wazoaktywny peptyd jelitowy, neuropeptyd Y, peptyd kodowany genem kalcytoniny) w tkankach jelit (jelito biodrowe, okrężnica zstępująca) oraz zwojach nerwowych (autonomicznych i czuciowych) zaopatrujących badane odcinki jelit w grupie zwierząt chorych. Uzyskane dane jednoznacznie potwierdzają udział badanych neuropeptydów w śródściennej i zewnątrzpochodnej regulacji przebiegu tego procesu chorobowego.

5.1.3.b.3

*Neuropeptides and lymphocyte populations in the porcine ileum and ileocecal lymph nodes during postnatal life. Wasowicz K., Winnicka A., Kaleczyc J., **Zalecki M.**, Podlasz P., Pidsudko Z.; PLoS One. 2018 May 29; 13(5):e0196458 (IF=2,766; MNiSW=40 pkt)*

Interakcje zachodzące pomiędzy elementami układu nerwowego i immunologicznego stanowią tematykę wielu współcześnie prowadzonych badań. W przeprowadzonym eksperymencie przestudiowano zmiany w korelacji obydwu układów w czasie postnatalnego rozwoju i dojrzewania jelit (jelito biodrowe, ujście biodrowo-ślepo-okrężnicze) świni domowej. Co ciekawe na terenie płytek chłonnych jelit nie stwierdzono obecności immunoreaktywnych (dla badanych neuropeptydów) włókien nerwowych, co jednak nie wyklucza możliwości oddziaływania na te struktury neuropeptydów uwalnianych przez okoliczne włókna nerwowe. Ponadto eksperyment wykazał zależne od wieku zwierząt zmiany stężenia wybranych neuropeptydów (galanina, wazoaktywny peptyd jelitowy) w badanych tkankach oraz różnice w liczebności niektórych subpopulacji limfocytów.

5.1.3.b.4

*Enteric nervous system in the European beaver (Castor fiber) pylorus – an immunohistochemical study. **Zalecki M.**, Makowska K., Gizejewski Z., Klimczuk M., Franke-Radowiecka A., Kasica-Jarosz N., Sienkiewicz W.; Pol J Vet Sci. 2019; 22(1):101-107 (IF=0,839; MNiSW=20 pkt)*

Żołądek bobra europejskiego wykazuje wysoce swoistą budowę (jak obecność gruczołu wpustowego), co związane jest ze specyficzną dietą spożywaną przez ten gatunek. Zwieracz odźwiernika dostosowujący szybkość opróżniania żołądka wydaje się mieć szczególne znaczenie w przypadku pokarmu składającego się z silnie zdrewniałych roślin. W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż organizacja śródściennego unerwienia odźwiernika bobra europejskiego jest podobna do unerwienia obserwowanego u innych ssaków, a neurony tam występujące wykazują immunoreaktywność dla głównych neuroprzekaźników regulujących pracę przewodu pokarmowego.

5.2 Udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych

W moim dorobku znajduje się 33 konferencyjnych doniesień naukowych, z których 19 prezentowanych było podczas konferencji międzynarodowych. W 15 doniesieniach konferencyjnych jestem pierwszym bądź wyłącznym autorem. Szczegółowe dane znajdują się w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Moje wystąpienie ustne zaprezentowane podczas międzynarodowej konferencji „Neuropeptides 2010” w Pécs na Węgrzech zostało uhonorowane nagrodą „Young investigator and travel award”.

Na międzynarodowej konferencji „XXX Congress of the European Association of Veterinary Anatomists” odbywającej się w miejscowości Cluj-Napoca w Rumunii zdobyłem prestiżową nagrodę LEISER PRIZE 2014 przyznaną co 2 lata (nieprzerwanie od roku 1986) przez European Association of Veterinary Anatomists tylko jednemu naukowcowi za działalność naukową prezentowaną podczas Kongresu EAVA.

Konferencje międzynarodowe w których uczestniczyłem czynnie (obecność na konferencji wraz z prezentacją wyników w formie plakatu lub wystąpienia ustnego):

- Federation of European Neuroscience Societies, FENS Summer School; Offir; Portugalia, 2005
- 12 th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Madryt, Hiszpania, 2008
- Neuropeptides 2010 – The 7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the American Summer Neuropeptide Conference, Pécs, Węgry, 2010
- XIV Conference of the Biogenic Amines and Related Biologically Active Compounds; Łódź; Polska, 2012
- X Congress European Neuropeptide Club & Summer Neuropeptide Conference & Polish Society of Veterinary Sciences, Gdynia, Polska, 2013
- XXX Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Cluj-Napoca, Rumunia, 2014
- International Conference “Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humans”, Lublin; Polska, 2014
- 20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP2014), Kyoto Garden Palace, Kyoto, Japonia, 2014
- RegPep2016 – International Regulatory Peptide Society - International Neuropeptide Society/Society for Biologically Active Peptides - the Summer Neuropeptide Conferences - the European Neuropeptide Club - the Groupe Français des Peptides et des Protéines, Rouen, Francja, 2016
- World Gastroenterology & Hepatology Conference, Rome, Włochy, 2018

5.3 Zestawienie dorobku naukowego - dotyczy tylko publikacji pełnotekstowych

5.3.1 Zestawienie liczbowe dorobku naukowego pod kątem rodzaju publikacji, faktu opublikowania w czasopismach z naliczonym IF (lista JCR = lista „A” MNiSW) z uwzględnieniem pierwszego/wyłącznego autorstwa.

Typ Publikacji	Autorstwo	Liczba publikacji		IF		MNiSW	
		Liczba	Odsetek	Suma	Odsetek	Suma	Odsetek
Artykuły oryginalne opublikowane w czasopismach z naliczonym IF (lista JCR = lista „A” MNiSW)	Publikacje w których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	9	39,1 %	20,431	57,4 %	257 pkt	47,2 %
	Pozostałe publikacje w których jestem współautorem	13	60,9 %	15,135	42,6 %	544 pkt	52,8 %
Artykuły opublikowane w czasopismach bez naliczonego IF (lista JCR = lista „B” MNiSW) i artykuły popularnonaukowe	Publikacje w których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	0	0	-	-	0	0
	Pozostałe publikacje w których jestem współautorem	2	100 %	-	-	6 pkt	100 %

5.3.2 Łączna liczba opublikowanych artykułów: **25**

5.3.3 Łączna punktacja opublikowanych artykułów wynosi:

a. Według współczynnika oddziaływania, impact factor (IF) – zgodnie z datą publikacji:

35,566

b. Według punktacji MNiSW – liczona zgodnie z wykazem list czasopism punktowanych MNiSW:

550 pkt

- dla artykułów publikowanych w latach 2013 – 2019 zgodnie z najnowszą listą, tj. listą zbiorczą z dn. 26.01.2017 (za lata 2013–2016)
- dla artykułów publikowanych w latach 2011 – 2012, zgodnie z listą obejmującą ten okres, tj. listą z dn. 21.12.2012
- dla artykułów publikowanych do roku 2010, zgodnie z ujednoliconym wykazem opublikowanym w roku 2010 uwzględniającym lata 2007-2010.

5.3.4 Pozostałe dane bibliograficzne według bazy „Thomson Reuters Web of Science”:

- liczba cytowań: **109** (79 bez autocytowań)
- H-index: **6**

5.4 Udział w projektach badawczych

W czasie swojej pracy naukowej realizowałem następujące projekty badawcze:

- a) N N308 1680 33: Lokalizacja i kodowanie chemiczne zewnątrzpochodnych neuronów zaopatrujących mięsień zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej – tzw. „grant doktorski”, projekt finansowany przez Komitet Badań Naukowych

Główny wykonawca
- b) N N308 233 638: Udział substancji P i galaniny oraz ich receptorów w eksperymentalnie wywołanym stanie zapalnym okrężnicy – projekt finansowany przez Komitet Badań Naukowych

Wykonawca
- c) IP2012 044172 – Grant „Juventus Plus”: Śródścienne projekcje nerwowe zaopatrujące zwieracz odźwiernika żołądka świni domowej oraz poziom ekspresji wybranych neuropeptydów i ich receptorów w stanie fizjologicznym oraz w przebiegu eksperymentalnie wywołanych owrzodzeń części odźwiernikowej żołądka – projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Kierownik i główny wykonawca

5.5 Doświadczenie naukowe zdobyte za granicą

Odbyłem następujące staże i szkolenia:

- Portugalia; FENS Summer School; kurs naukowy; lipiec 2005; jednostka kierująca: UWM
- Węgry; University of Pécs; Department Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Pécs, 12 Szigeti str, Pécs, Węgry, Bezpośredni opiekunowie naukowci: Prof. Erika Pintér (h-index = 47; liczba cytowań: 9432), Prof. Zsuzsanna Helyes (h-index = 34; liczba cytowań: 4017); staż naukowy; październik 2010; jednostka kierująca: UWM
- Izrael; University of Tel-Aviv - Sackler Faculty of Medicine; Bezpośredni opiekun naukowy: Prof. Illana Gozes (h-index = 63; liczba cytowań: 14752), staż naukowo-dydaktyczny; listopad-grudzień 2011; jednostka kierująca: UWM
- Węgry; University of Pécs; Department Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Pécs, 12 Szigeti str, Pécs, Węgry; Bezpośredni opiekun naukowy: Prof. Erika Pintér; długoterminowy (6-miesięczny) staż naukowy (01.09-30.11.2016 oraz 01.04-30.06.2017); finansowanie zdobyte w ramach Konkursu na stypendia naukowe POST – DOC finansowane przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”; jednostka kierująca: UWM

6. Działalność organizacyjna oraz w zakresie popularyzowania nauki

6.1 Działalność organizacyjna

Moja działalność organizacyjna związana jest z zaangażowaniem w pełnienie różnych funkcji.

Do szczególnie istotnych osiągnięć zaliczam moje bezpośrednie zaangażowanie w proces wprowadzania systemu elektronicznej obsługi międzynarodowego czasopisma „Polish Journal of Veterinary Sciences” (<http://spjvs.uwm.edu.pl/> ; <http://www.uwm.edu.pl/pjvsci/>) którego aktualny Impact Factor wynosi 0,839, i jest to jedno z najlepszych czasopism o tematyce weterynaryjnej w naszym regionie Europy. Od roku 2015 jestem głównym reprezentantem Czasopisma we wszystkich etapach tworzenia (projektowanie) i wprowadzania (wielomiesięczne konsultacje i testy działania) systemu obsługi online. Od początku roku 2016 pełnię prestiżową funkcję Redaktora odpowiedzialnego za obsługę prac nadsyłanych w wersji elektronicznej. Elektroniczne przysyłanie prac jest obecnie najpopularniejszą formą dostarczania artykułów do Redakcji, o czym świadczy baza systemu „PJVS online” licząca ponad 8000 zarejestrowanych użytkowników (dane na rok 2019) i ponad 1000 przysyłanych publikacji z różnych państw całego Świata. W tym miejscu muszę dodać, że pełnienie tej prestiżowej funkcji jest bardzo czasochłonne i wymaga dużej elastyczności i twórczego działania tak w bieżącej obsłudze systemu jak również w rozwiązywaniu problemów zgłaszanych przez autorów i recenzentów, które wynikają z rozmiarów tego przedsięwzięcia. W celu naświetlenia złożoności procesu publikacyjnego przedstawiam skrócony cykl etapów które przechodzi każdy nadesłany do Czasopisma artykuł, z których większość wymaga bezpośredniej obsługi w systemie online – są to: wstępna korekta techniczna, rozsyłanie zaproszeń do recenzentów, rozsyłanie recenzji do autorów (w przypadku wielu artykułów te dwa etapy są powtarzane wielokrotnie – do momentu zaakceptowania poprawek przez recenzenta bądź odrzucenia pracy), rozsyłanie ostatecznej decyzji do autorów, przekierowywanie artykułu do korekty językowej, odsyłanie skanu artykułu z naniesionymi poprawkami językowymi do autora, przysyłanie poprawionej przez autora wersji artykułu do zecera, odsyłanie tzw. szczotki do autorów celem weryfikacji przedprodukcyjnej wersji pracy, nanoszenie ewentualnych poprawek autorskich, końcowa weryfikacja, składanie numeru i ostatecznie drukowanie papierowej wersji artykułu i przysyłanie wersji elektronicznej do publikacji online.

Do sukcesów prowadzonej działalności organizacyjnej zaliczam również swoją funkcję współorganizatora i głównego sekretarza pełnioną podczas międzynarodowej konferencji naukowej „10th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference”.

W roku 2008 byłem zaangażowany w przygotowania i organizację XIII Kongresu Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych który odbywał się na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Od roku 2012 nieprzerwanie pełnię funkcję skarbnika w Olsztyńskim Oddziale Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, którego jestem członkiem.

Jestem członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (jako przedstawiciel nauczycieli akademickich niebędących samodzielnymi pracownikami naukowo-dydaktycznymi).

Jestem również aktywnym recenzentem czasopism naukowych z listy JCR, dla których przygotowałem łącznie 39 recenzji w języku angielskim. Recenzowałem artykuły naukowe dla takich czasopismach jak:

- Annals of the New York Academy of Sciences (IF 4,277)
- Experimental and Molecular Pathology (IF 2,566)
- Journal of Chemical Neuroanatomy (IF 2,162)
- International Journal of Surgery Research and Practice
- Neurological Research (IF 1,449)
- Polish Journal of Veterinary Sciences (IF 0,839)
- The Anatomical Record – (IF 1,373)
- Tissue & Cell – (IF 1,438)

6.2 Działalność w zakresie popularyzowania nauki

Moim bezpośrednim zaangażowaniem w popularyzację nauki była pełniona przeze mnie funkcja głównego organizatora (z ramienia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej) festynu popularnonaukowego „Piknik Nauki i Sztuki Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego” odbywającego się na Starym Mieście w Olsztynie w dniu 31.05.2014. Byłem również wykładowcą podczas akcji popularyzujących naukę wśród młodzieży, takich jak „Noc Naukowców” czy „Kętrzyńskie Dni Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego”. Brałem także czynny udział w Międzynarodowych Sympozjach Kół Naukowych MSKN w sekcji Nauk Weterynaryjnych pełniąc funkcję jurora, a także recenzenta doniesień naukowych przesyłanych na część konkursową. Wielokrotnie prezentowałem ciekawostki i preparaty anatomiczne oraz zasady działania mikroskopu konfokalnego młodzieży oraz dzieciom odwiedzającym naszą Katedrę w ramach wycieczek szkolnych a także w trakcie cyklicznego wydarzenia „Dzień Otwartych Drzwi” Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.

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

7.1 Wprowadzanie nowoczesnych technik dydaktycznych

W swojej pracy związanej z działalnością dydaktyczną bezpośrednio uczestniczyłem we wprowadzaniu nowoczesnych technik dydaktycznych umożliwiających naukę Anatomii Zwierząt „na odległość”, z wykorzystaniem komputerów i sieci teleinformatycznych.

Brałem bezpośredni udział w realizacji projektu pt. „Utworzenie Warmińsko-Mazurskiego Portalu Weterynaryjnego wraz z budową baz danych i digitalizacją zasobów” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Warmia i Mazury na lata 2007 – 2013. W wyniku prowadzonych prac powstał serwis internetowy „Portal Weterynaryjny” (<http://wet.uwm.edu.pl/>) w którym współtworzyłem koncepcję serwisu umożliwiającego umieszczanie filmów dydaktycznych (z zakresu preparacji anatomicznych) oraz wirtualnych preparatów anatomicznych dostępnych dla studentów Medycyny Weterynaryjnej z dowolnej lokalizacji na świecie. Uczestniczyłem we wszystkich etapach tworzenia tego serwisu, łącznie z przeprowadzaniem wielogodzinnych testów i nanoszeniem poprawek. Po uruchomieniu Portalu przygotowałem filmy prezentujące preparację wszystkich okolic przedstawianych podczas zajęć praktycznych z Anatomii Zwierząt. Podczas nagrań nieocenioną rolę odegrała dr. Grażyna Markiewicz-Miller, emerytowany wykładowca naszej Katedry, która przedstawiała i opisywała struktury anatomiczne. Wszelkie pozostałe czynności związane z nagrywaniem, montażem, opisem, konwertowaniem i zamieszczaniem wszystkich filmów wykonałem samodzielnie. W celu udostępnienia studentom preparatów anatomicznych znajdujących się w naszej Katedrze poprzez stronę Portalu Weterynaryjnego byłem bezpośrednio odpowiedzialny za przeprowadzenie digitalizacji obiektów przy wykorzystaniu skanera 3D. Wymagało to nauczania się obsługi zupełnie nowej techniki skanowania przestrzennego (Skaner 3D), która jest wysoce specjalistyczna i bardzo czasochłonna. Co więcej, wykorzystanie skanera do tego typu zadań [wg informacji producenta (niemieckiej firmy „Polygon technology”) ten model skanera jest głównie wykorzystywany przez wojsko] było wyzwaniem nawet dla inżynierów konstruujących urządzenie gdyż w czasie użytkowania powstało wiele problemów natury technicznej, które wymagały wielu video konsultacji z producentem urządzenia. Efektem mojego bezpośredniego zaangażowania w cały projekt są udostępnione na stronach portalu (<http://wet.uwm.edu.pl/>) wirtualne obiekty przestrzenne wybranych preparatów anatomicznych ze zbiorów naszej Katedry oraz filmy dydaktyczne cieszące się bardzo dużą popularnością wśród studentów naszego Wydziału, z których jak mi wiadomo, korzystają również studenci innych Wydziałów.

Pełnię również funkcję administratora podstrony internetowej dotyczącej Katedry w której jestem zatrudniony.

Jestem również bezpośrednio zaangażowany w aktualnie trwające prace projektowe związane z planowanym remontem naszej Katedry, w których zajmuję się tematyką wyposażenia sal prosektoryjnych w nowoczesne systemy multimedialne umożliwiające oglądanie na żywo (na dużych monitorach) wykonywanych preparacji anatomicznych, ich transmisję, rejestrację, nakładanie grafiki na uzyskane obrazy celem uwidaczniania preparowanych struktur anatomicznych i udostępnianie tych materiałów studentom naszego Wydziału.

Rozwijając wiedzę na temat możliwości wykorzystania nowoczesnych technik dydaktycznych uczestniczyłem w konferencji ds. dydaktycznych w związku z realizacją projektu europejskiego pt. „Use of virtual patients/virtual problems in veterinary basic sciences” w Lublinie w 2014r.

7.2 Opieka nad studenckimi kołami naukowymi

Od roku 2011 (do dziś) pełnię funkcję bezpośredniego opiekuna grupy studentów należących do Olsztyńskiego Koła Naukowego Anatomów Weterynaryjnych. Pod moim nadzorem studenci uczą się technik badawczych stosowanych w laboratoriach naszej Katedry (barwień immunohistochemicznych, mikroskopii konfokalnej, techniki Real-Time PCR), uczestniczą w prowadzonych badaniach, a także realizują własne pomysły naukowe. Uzyskane wyniki prezentowane były na Międzynarodowych Seminariach Kół Naukowych, a także krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Do szczególnych osiągnięć w tej materii należy zaliczyć współpracę z panią Krystyną Makowską (studentką rodzimego Wydziału) która zaowocowała zdobyciem pierwszego miejsca za najlepszą publikację w Ogólnopolskim Konkursie Weterynaryjnych Studenckich Kół Naukowych Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w 2013 roku odbywającym się w Warszawie. Studentka uhonorowana została nagrodą w postaci wycieczki do Francji. Należy również wspomnieć o wyróżnieniu zdobytym podczas XLII Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych 2013 w Olsztynie przez panią Weronikę Czyż (studentkę rodzimego Wydziału) za przedstawioną prezentację ustną. Nagrodą dla studentki był intensywny kurs językowy.

7.3 Zajęcia dydaktyczne

Od początku swojej pracy na Uczelni, tj. od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich w 2004 roku, nieprzerwanie prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotu Anatomia Zwierząt dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i/lub studentów Wydziału Bioinżynierii Zwierząt tutejszego Uniwersytetu. Od rozpoczęcia swoich studiów w roku 1998 fascynowała mnie wiedza z zakresu Anatomii Zwierząt, o

czym może świadczyć fakt zdobycia przeze mnie pierwszego miejsca w Ogólnopolskim Konkursie Wiedzy Anatomicznej „*Vena Nostra*” w 2000 roku we Wrocławiu. To właśnie upodobanie tej dziedziny nauki i chęć przekazywania wiedzy w sposób możliwie zrozumiały skłoniło mnie do podjęcia studiów doktoranckich w Katedrze w której pracuję do dziś. Nauczanie Anatomii Zwierząt sprawia mi ogromną przyjemność, a bardzo pozytywne oceny i komentarze uzyskiwane w corocznych anonimowych ankietach studenckich stanowią dla mnie najcenniejszą zapłatę.

07.03.2019

M. Załęcki