

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Zenon Pidsudko

Katedra Anatomii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2014

1. Imię i nazwisko:

ZENON PIDSUDKO

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

- Stopień naukowy: **doktor nauk weterynaryjnych**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn, rok 2000, tytuł rozprawy doktorskiej - „**Rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów zwoju kręzkowego tylnego zaopatrujących trójkąt pęcherza moczowego**”
- Stopień naukowy: **lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, rok 1994

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- od 01.10.1993 do 30.06.1994 - Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, na stanowisku asystenta-stażysty
- od 01.10.1994 do 01.09.1999 – Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, na stanowisku asystenta
- od dnia 01.09.1999 roku do dnia dzisiejszego – Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, na stanowiskach:
 - od 01.09.1999 do 01.05.2001 roku Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, na stanowisku asystenta
 - od 01.05.2001 do dnia dzisiejszego, Katedra Anatomii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, na stanowisku adiunkta

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zmianami)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Jednotematyczny cykl publikacji pt. „**Rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy samca świni**”

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

- 1. Pidsudko Z.**, “Immunohistochemical characteristics and distribution of neurons in the intramural ganglia supplying the urinary bladder in the male pig.” *Pol J Vet Sci* 16 (4): 629-638, 2013; **IF₂₀₁₂ = 0,570; punktacja MNiSW₂₀₁₂ = 20; MNiSW₂₀₁₃ = 20**

Wkład w autorstwo publikacji:

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), udziale w wykonaniu operacji chirurgicznych i zebraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych służących do zebrania wyników badań, statystycznym opracowaniu wyników badań oraz ich pełnej interpretacji, napisaniu manuskryptu pracy. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

- 2. Pidsudko Z.** „Immunohistochemical characteristics and distribution of sensory dorsal root ganglia neurons supplying the urinary bladder in the male pig.” *J Mol Neurosci*, DOI 10.1007/s12031-013-0117-2, 2013; (52: 71-81, 2014), **IF₂₀₁₂ = 2,891; punktacja MNiSW₂₀₁₂ = 20; MNiSW₂₀₁₃ = 20**

Wkład w autorstwo publikacji:

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), udziale w wykonaniu operacji chirurgicznych i zebraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych służących do zebrania wyników badań, statystycznym opracowaniu wyników badań oraz ich pełnej interpretacji, napisaniu manuskryptu pracy. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

3. Pidsudko Z., "Immunohistochemical characteristics and distribution of neurons in the paravertebral, prevertebral and pelvic ganglia supplying the urinary bladder in the male pig" J Mol Neurosci, DOI 10.1007/s12031-013-0139-9, 2013; (52: 56-70, 2014), **IF**₂₀₁₂ = **2,891**; **punktacja MNiSW**₂₀₁₂ = **20**; **MNiSW**₂₀₁₃ = **20**

Wkład w autorstwo publikacji:

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), współudziale w wykonaniu operacji chirurgicznych i zebraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych służących do zebrania wyników badań, statystycznym opracowaniu wyników badań oraz ich pełnej interpretacji, napisaniu manuskryptu pracy. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

Łączna punktacja 3 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji wynosi:

- wg listy czasopism punktowanych **MNiSW**₂₀₁₂ = **60 pkt.**
- łączna wartość wskaźnika *Impact Factor* (**IF**) = **6,352**

Badania finansowane były z projektu badawczego własnego nr N N308 233438, pt.:

„Rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy samca świni” przyznanego przez MNiSW (w latach 2010-2012), kierownik: dr n. wet. Zenon Pidsudko

Legenda:

Analiza cytowań została przeprowadzona w bazie *Web of Science* 6 grudnia 2013 r.:

WoS_{Search} = 0 – prace zindeksowane w bazie *Web of Science*, ale nie cytowane w tej bazie

WoS_{Search} = prace zindeksowane i cytowane w bazie *Web of Science*

WoS_{CRS} = prace cytowane w bazie *Web of Science*, ale nie zindeksowane w tej bazie

Wartości wskaźnika *Impact Factor* (*IF*) podane wg bazy *Journal Citation Reports*

IF = wartości wskaźnika *Impact Factor* zgodne z rokiem publikacji

IF₂₀₁₂ = wartości wskaźnika *Impact Factor* odnoszą się do edycji *Journal Citation Reports* (*JCR*) z 2012 r. Należy je skorygować po ukazaniu się edycji *JCR* z 2013 r. (czerwiec 2014 r.)

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

WSTĘP

Narządy układu moczowo-płciowego ssaków unerwione są, zarówno przez współczulne i przywspółczulne neurony autonomicznego układu nerwowego, jak i neurony czuciowe, zlokalizowane w zwojach rdzeniowych. Układ nerwowy wywiera istotny wpływ na funkcje tych narządów, regulując liczne procesy fizjologiczne, związane np. w przypadku narządów płciowych, z transportem plemników z jąder do cewki moczowej, ejakulacją, zapłodnieniem lub porodem (De Groat and Steers 1990), czy też z gromadzeniem, a następnie okresowym wydalaniem moczu (Brading 1999).

Z danych dostępnych w literaturze wiadomo, że wzory unerwienie pęcherza moczowego, jak i tworzących je włókien nerwowych badane były u szczura (Yoshimura and De Groat 1999; Zvarova et al. 2004), świnki morskiej (Zhou and Ling 1998), myszy (Moss et al. 1990), królika (Gibbins 1982), kota (Wakabayashi et al. 1995), psa (Stief et al. 1990), konia (Prieto et al. 1990), świni (Crowe and Burnstock 1989; Persson et al. 1995). Jak wynika z powyższego zestawienia, zdecydowana większość istniejących danych uzyskana została na modelu gryzoni i innych zwierzętach laboratoryjnych, czy hodowlanych, jednak w świetle wyników uzyskanych na materiale pochodzącym od człowieka (Drake et al. 2000), dane te nie odpowiadają wynikom uzyskanym u ludzi. Jak już wspomniano, w badaniach Crowe i Burnstock'a (Crowe and Burnstock 1989), a także Person i in. (Persson et al. 1995) wykazano, że świnia wydaje się być dobrym modelem zwierzęcym dla badań dolnych dróg moczowych człowieka.

Z przeglądu dostępnej literatury wynika, że unerwienie pęcherza moczowego pochodzi z wielu źródeł. Włókna współczulne pochodzą ze zwoju kręzkowego tylnego (IMG) (Vera and Nadelhaft 1992) oraz zwojów pnia współczulnego (Vera and Nadelhaft 1992). Włókna przywspółczulne pochodzą natomiast zarówno ze śródściennych zwojów trójkąta pęcherza moczowego (Pidsudko 2004; Smet et al. 1996), jak i zwoju miedniczego (u samców) (Mohammed and Santer 2002) bądź zwoju przyszyjkowego u samic (Mitchell et al. 1993). Komponenta dośrodkowa (afferentna) pochodzi natomiast z rdzeniowych zwojów czuciowych (Zvarova et al. 2004).

Wiadomo, że unerwienie pęcherza nie tylko pochodzi z różnych źródeł, ale także włókna nerwowe zawierają różne „zestawy” substancji przekaźnikowych (tzw. kody chemiczne),

dzięki czemu mogą w różny sposób oddziaływać na unerwiany narząd w zależności od miejsca pochodzenia i typu unerwianej tkanki. Włókna współczulne jako przekaźników używają katecholamin (Warburton and Santer 1994) i neuropeptydu Y (Warburton and Santer 1994), podczas gdy włókna przywspółczulne są w większości cholinergiczne (głównym ich transmiterem jest acetylocholina – ACh (Dixon et al.; Persson et al. 1995)), mogą jednak także wykorzystywać jako substancje przekaźnikową tlenek azotu (NO) (Persson et al. 1995) lub wyłącznie neuropeptydy (Zhou and Ling 1998).

Należy podkreślić, iż współczesna neuroanatomia dysponuje technikami umożliwiającymi precyzyjną lokalizację neuronów zaopatrujących badane struktury oraz określenie chemicznych cech (kodowania chemicznego) tych komórek nerwowych. Badanie takie prowadzone są z wykorzystaniem różnorodnych technik znakowania wstecznego neuronów z użyciem znaczników wstecznych, takich jak Fast Blue (FB), DII, fragment B toksyny przecinkowca cholery oraz znacznika wirusowego (wirus choroby Aujeszkego). Należy zaznaczyć, iż właśnie w Katedrze Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UW-M w Olsztynie od wielu lat prowadzone są intensywne prace badawcze mające na celu określenie źródeł zaopatrzenia nerwowego samiczych i samczych narządów rozrodczych świni domowej, np. badania prowadzone przez Kaleczyc i Wąsowicza (Kaleczyc et al. 2002; Wasowicz 2003), gdzie do ustalenia precyzyjnej lokalizacji neuronów zaopatrujących badane struktury wykorzystywali właśnie jeden ze wspomnianych wyżej znaczników wstecznych, z jednoczesnym określeniem metodami immunohistochemicznymi obecności neuropeptydów i wybranych enzymów syntezy NA, ACh i NO w neuronach zaopatrujących narządy układu rozrodczego świni. Na uwagę zasługuje również fakt, iż autor niniejszego wniosku w swojej pracy doktorskiej także zbadał lokalizację neuronów zaopatrujących trójkąt pęcherza moczowego samicy świni oraz ich immunohistochemiczne cechy. W badaniach tych wykazano, iż neurony zaopatrujące trójkąt pęcherza zlokalizowane były przede wszystkim w zwoju krezkowym tylnym (CaMG; albo dolnym - IMG), gdzie rozmieszczone były w sposób uporządkowany (Pidsudko 2000), co świadczy o somatotopowej organizacji tego zwoju oraz wskazuje prawdopodobnie na podobieństwo takiego zjawiska na terenie innych zwojów przedkręgowych samicy świni. Podobny uporządkowany rozkład neuronów w IMG i w zwoju miednicznym przednim (APG), wykazał Kaleczyc w badaniach dotyczących unerwienia męskich narządów rozrodczych (Kaleczyc 1997).

Neurony zaopatrujące trójkąt pęcherza moczowego autor niniejszego autotreferatu znalazł dodatkowo w zwojach splotu miednicznego – zwoju przyszyjkowym. oraz niektórych zwojach rdzeniowych lędźwiowych i krzyżowych (neurony znajdowały się głównie

w zwojach L3-L5 i S1-S3) a także w zwojach śródściennych trójkąta (Pidsudko 2004).

Należy podkreślić, iż zwój przyszyjkowy jest tworem unikalnym, ponieważ zawiera zarówno neurony współczulne jak i przywspółczulne. Przedzwojowe włókna nerwowe docierają do tego zwoju dwiema drogami. Włókna pochodzące z neuronów jąder pośrednio-bocznych rdzenia kręgowego odcinka lędźwiowego dochodzą do niego wraz z nerwem podbrzusznym. Drugą drogą jest nerw miedniczny, który przewodzi głównie włókna z jąder pośrednio-przyśrodkowych odcinka krzyżowego rdzenia kręgowego. Z dostępnej literatury wynika, iż morfologia splotu miedniczego wraz z tworzącymi je zwojami jest bardzo zróżnicowana międzygatunkowo. U ssaków naczelnych (w tym i człowieka), królików, psów, czy też kotów struktura ta ma charakter sieci o skomplikowanej budowie, zawierające liczne, drobne zwoje nerwowe połączone gałęziami międzyzwojowymi utworzonymi przez włókna przed- i zazwojowe pochodzące spoza splotu, a także zazwojowe włókna pochodzące z samych zwojów miednicznych. W przypadku szczura i myszokoczka neurony splotu miednicznego występują w postaci dużego skupiska neuronów, zwanego zwojem miednicznym większym (MPG), u samic zwanym zwojem przyszyjkowym (PCG) oraz drobnymi satelitarnymi zwojami dodatkowymi (AG). Z inną sytuacją mamy do czynienia w przypadku świnki morskiej i myszy, u których opisuje się dwie duże struktury nerwowe: zwoje miedniczne przednie, podobnie jak u szczura zwane u samic zwojem przyszyjkowym i zwoje miedniczne tylne (przegląd literatury w (Kaleczyc 1997)). Mało jest danych na temat morfologii splotu miednicznego u dużych zwierząt gospodarskich. Morfologia i topografia tego splotu została opisana u owcy, knura i lochy (przegląd literatury w (Kaleczyc 1997; Majewski 1997)).

Należy podkreślić fakt, iż niezwykle istotną kwestią jest to, że istnieją bardzo znaczące różnice między samcem a samicą dotyczące organizacji struktur biorących udział w unerwieniu narządów układu moczopłciowego a przede wszystkim organizacji anatomicznej splotu miednicznego. U samca świni występują dwa duże zwoje – zwane zwojami miednicznymi doczaszkowymi – APG, położonymi w okolicy szyjki pęcherza moczowego, za którymi przebiega ciąg drobniejszych zwojów układających się wzdłuż miednicznego odcinka przewodu moczopłciowego i, co ważne, odchodzą od niego pęczki włókien do okolicy trójkąta i szyjki pęcherza moczowego oraz do gruczołu pęcherzykowego i trzonu prostaty (Kaleczyc 1997), natomiast u samicy neurony miedniczne zlokalizowane są w zwoju przyszyjkowym – PCG leżącym w bezpośrednim sąsiedztwie szyjki macicy i pochwy (Majewski 1997). Ponadto wspomniane różnice płciowe dotyczyły również liczby neuronów wchodzących w skład zwojów splotu miednicznego. Wykazano, że u samca świni

znajdowało się znacznie więcej neuronów leżących w zwojach splotu miednicznego (APG) zaopatrujących narządy układu rozrodczego, w stosunku do analogicznej struktury splotu miednicznego u samic – PCG. Podobne wyniki uzyskano u szczura, gdzie wykazano znacząco większą liczbę neuronów w zwojach splotu miednicznego u samca, niż u samicy (Greenwood et al. 1985). Wspomniane różnice między samcem a samicą świni dotyczyły również kodowania chemicznego neuronów wchodzących w skład innego zwoju autonomicznego – zwoju kręzkowego tylnego (IMG; drugiego, zasadniczego zwoju charakterystycznego dla neuronów zaopatrujących narządy układu moczopłciowego) (Kaleczyc et al. 1994).

Przedstawiono zatem bardzo mocne przesłanki ku temu, że unerwienie narządów układu moczowo-płciowego u samca i samicy wykazuje znaczące różnice dotyczące zarówno ilości neuronów występujących w zwojach, jak i ich chemicznego kodowania. Zbadanie więc komórek nerwowych wchodzących w skład zwojów autonomicznych w kontekście uzyskania informacji dotyczących wzoru unerwienia oraz charakterystyki chemicznej neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy u samca świni domowej może dostarczyć wielu danych dotyczących jego roli i wpływu na funkcje układu moczowego oraz rozrodczego, wobec faktu bycia strukturą stanowiącą funkcjonalną całość układu moczopłciowego. Jeszcze raz należy podkreślić, że proponowane badania, które były przeprowadzone na samcu świni domowej, pozwoliły na dokonanie porównania, czy istniały różnice w unerwieniu pęcherza moczowego ze względu na płęć, a także w kodowaniu chemicznym neuronów zaopatrujących poszczególne struktury pęcherza. Pozwoliły także na postawienie kompleksowej odpowiedzi na pytania, jakie konkretnie struktury nerwowe brały udział w unerwieniu tego narządu oraz jakie było kodowanie chemiczne neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy. Ponadto, pomimo ciągłego wzrostu znaczenia świni jako zwierzęcia hodowlanego i najbardziej optymalnego zwierzęcia laboratoryjnego w badaniach biomedycznych (Swindle et al. 1992), wiedza dotycząca zarówno neuronalnych mechanizmów regulacyjnych dotyczących rozrodu, gromadzenia i wydalania moczu, oraz chorób związanych z tymi układami (które są przecież ściśle wzajemnie powiązane), jak i struktury oraz chemizmu ośrodków nerwowych włączonych w regulację występujących tam pętli odruchowych, była u tego gatunku fragmentaryczna. Należy jeszcze raz podkreślić, iż aktualnie dostępne informacje na temat źródeł unerwienia oraz immunochemicznej charakterystyki neuronów unerwiających pęcherz moczowy samca świni są często cząstkowe.

CELE BADAWCZE

Celem niniejszych badań było zbadanie obecności substancji biologicznie aktywnych występujących w neuronach zaopatrujących struktury pęcherza moczowego samca świni, rozmieszczonych na terenie obwodowego układu nerwowego, a także dokładne zlokalizowanie i zbadanie wzorów rozmieszczenia neuronów w poszczególnych zwojach nerwowych odpowiedzialnych za właściwe funkcjonowanie pęcherza moczowego. W związku z powyższym postawiono następujące zadania:

- 1. Zlokalizowanie obwodowych neuronów autonomicznych i czuciowych zaopatrujących wierzchołek pęcherza moczowego samca świni w zwojach przed- i przykręgowych oraz w zwojach rdzeniowych.**
- 2. Zlokalizowanie obwodowych neuronów autonomicznych i czuciowych zaopatrujących trójkąt pęcherza moczowego samca świni w zwojach przed- i przykręgowych oraz w zwojach rdzeniowych.**
- 3. Zlokalizowanie obwodowych neuronów autonomicznych i czuciowych zaopatrujących szyjkę pęcherza moczowego samca świni w zwojach przed- i przykręgowych oraz w zwojach rdzeniowych.**
- 4. Zbadanie chemicznego kodowania tych neuronów, czyli ujawnienie jakie substancje biologicznie aktywne – enzymy syntezy neurotransmiterów oraz neuropeptydy – zawierają te neurony.**
- 5. Zbadanie chemicznego kodowania neuronów śródściennych obecnych w ścianie wymienionych części pęcherza moczowego samca świni.**
- 6. Zbadanie zawartości substancji biologicznie aktywnych występujących w zwojach nerwowych, które są kluczowe dla układów regulujących funkcje pęcherza moczowego (TH, DBH – enzymy syntezy katecholamin – markerów neuronów współczulnych - ChAT, VACHT – enzymów związanych z syntezą i transportem acetylocholiny – zasadniczego neuroprzekaźnika neuronów przywspółczulnych) metodami biologii molekularnej – Western blot (zastosowanie tej metody pozwoliło w bardzo precyzyjny sposób potwierdzić i zweryfikować jakość użytych przeciwciał i wykazać obecność tych enzymów w zwojach zaopatrujących struktury pęcherza moczowego. Wymienione enzymy są substancjami pozwalającymi na weryfikację i przynależność danego neuronu do dwóch zasadniczych populacji obwodowego układu nerwowego – neuronów współczulnych i przywspółczulnych)**

MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone na 15 samcach świni domowej o wadze 12-15 kg. Zwierzęta podzielone były na cztery grupy doświadczalne:

Grupa I (A) (n=4) – zwierzęta, którym podano FB do wierzchołka pęcherza moczowego,

Grupa II (T) (n=4) - zwierzęta, którym podano FB do trójkąta pęcherza moczowego,

Grupa III (C) (n=4) - zwierzęta, którym podano FB do szyjki pęcherza moczowego,

Grupa IV (I) (n=3) – zwierzęta do badań ekspresji kluczowych substancji biologicznie aktywnych występujących w zwojach nerwowych regulujących pracę pęcherza moczowego za pomocą metod biologii molekularnej – Western-blot

Eksperymenty polegały na podaniu znacznika fluorescencyjnego Fast Blue (FB) do tkanek wierzchołka, trójkąta i szyjki pęcherza moczowego w celu wyznakowania komórek nerwowych odpowiedzialnych za unerwienie wspomnianych struktur.

U wszystkich zwierząt, podczas operacji przeprowadzonej w narkozie pentobarbitalowej wstrzyknięto 5% zawiesina FB w ogólnej ilości 40 μ l na każdą strukturę pęcherza w 20 iniekcjach po 2 μ l. Po upływie 4 tyg. świni z grup I-III zostały powtórnie uśpione i od tych zwierząt po utrwaleniu ich metodą perfuzji transkardialnej 4% zbuforowanym roztworem paraformaldehydu (pH 7.4) pobrano zwoje mogące zaopatrywać poszczególne struktury pęcherza moczowego. Pobrano pęcherze moczowe (w celu lokalizacji zwojów śródściennych - IG) zwoje splotu miednicznego (APG), zwoje przedkręgowo (CaMG/IMG, CSMG), zwoje pnia sympatycznego (SChG), zwoje czuciowe rdzenia kręgowego (DRG). Pobrany materiał dotrwalono w tym samym roztworze, który był użyty do perfuzji przez około 20 minut. Następnie pobrany materiał płukano w buforze fosforanowym przez 24 godziny, a potem umieszczono w 18% roztworze sacharozy. Tkanki po ich zatonięciu, co wskazuje na prawidłowe wysycenie roztworem sacharozy, który pełni rolę krioprotektora, pokrojono za pomocą mikrotomu mrozeniowego na seryjne skrawki o grubości 10-12 μ m. Uzyskane skrawki nałożono na szkiełka podstawowe i poddano analizie z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, co pozwoliło precyzyjnie określić, które zwoje stanowiły źródło zaopatrzenia poszczególnych struktur pęcherza moczowego. Wyselekcjonowane w ten sposób szkiełka podstawowe ze skrawkami zostały poddane barwieniom immunohistochemicznym z wykorzystaniem komercyjnych mono- i poliklonalnych, różnogatunkowych przeciwciał skierowanych przeciwko neuropeptydom, jak też enzymatycznym markerom struktur adrenergicznych, cholinergicznym i nitrergicznym. W doświadczeniu wykorzystano pierwotne przeciwciała skierowane przeciwko hydroksylazie

tyrozyny (TH), β -hydroksylazie dopaminy (DBH), acetylotransferazie cholinowej (ChAT), transporterowi pęcherzykowemu acetylocholino (VAChT), syntetazie tlenku azotu (NOS), neuropetydowi Y (NPY), somatostatynie (SOM), galaninie (GAL), naczynioaktywnemu peptydowi jelitowemu (VIP), peptydowi kodowanemu genem kalcytoniny (CGRP) oraz substancji P (SP). Użycie gatunkowo specyficznych przeciwciał wtórnych (zarówno przeciwciała „pełne”, jak i fragmenty F(ab)) sprzężonych z odpowiednimi fluorochromami (FITC, Alexa) pozwoliło na wykonanie podwójnych barwień immunofluorescencyjnych. Wybarwione preparaty analizowano przy zastosowaniu technik mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej (mikroskop konfokalny firmy Zeiss LSM 710)

Po ustaleniu dokładnej lokalizacji neuronów zaopatrujących wymienione struktury pęcherza do badań metodą biologii molekularnej pobrano tylko te zwoje, w których występowały wyznakowane neurony i poddano je analizie pod kątem obecności kluczowych substancji enzymatycznych za pomocą metody Western-blot zgodnie z procedurami polegającymi na rozdzielaniu różnych rodzajów białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i przeniesienia ich na trwałą „podstawę”, jaką jest membrana PVDF (poliwinylodifluorek). Następnie poprzez inkubację tej membrany ze specyficznymi przeciwciałami pierwotnymi (TH, DBH oraz ChAT, VAChT) oraz odpowiednimi przeciwciałami wtórnym nastąpiła identyfikacja poszukiwanego białka. Inne substancje, jak np. peptydy nie mogły być analizowane standardowo za pomocą tej metody, gdyż były to substancje drobnocząsteczkowe i posiadały zbyt mały ciężar cząsteczkowy białka.

W celu określenia udziału komórek nerwowych zawierających badaną kombinację antygenów liczone do 300 FB+ neuronów dla każdej kombinacji surowic. Liczba immunoreaktywnych profili komórkowych została obliczona jako procent immunoreaktywnych neuronów w odniesieniu do wszystkich policzonych FB+ komórek. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie \pm SEM. Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą sparowanego testu T-Studenta (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc.) Różnice uznano za statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$ - *, $p \leq 0,01$ - **, $p \leq 0,005$ - ***.

Wszelkie dokładne informacje dotyczące tych zagadnień zostały zawarte w poszczególnych pracach stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania prowadzone zostały przy użyciu techniki wstecznego znakowania neuronów z użyciem fluorescencyjnego znacznika Fast Blue (FB) oraz metod immunohistochemicznych i biologii molekularnej. Znakowanie neuronów z użyciem znaczników wstecznych jest nowoczesną metodą wykorzystywaną w pracach poświęconych określeniu źródeł zaopatrzenia wielu narządów. FB wprowadzony do tkanek jest pobierany przez zakończenia nerwowe znajdujące się w tkance i transportowany wstecznym transportem aksonalnym do perikarionu komórki nerwowej. FB akumuluje się w komórce nerwowej i może być łatwo wykryty przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego nawet po upływie kilkunastu tygodni od podania go do tkanek. Istotną cechą tego znacznika jest też specyfikacja fluorescencji, która nie koliduje z fluorescencją emitowaną przez używane w barwieniach immunohistochemicznych fluorochromy (Alexa 488, Alexa 555). Pozwala to na wykonanie oznaczeń obecności substancji biologicznie aktywnych w komórkach wyznakowanych FB.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań w **publikacji pierwszej (Pidsudko 2013a)** wykazały, że zwoje śródścienne (IG) znajdujące były w takich strukturach męskiego pęcherza moczowego (UB) jak trójkąt (T) oraz szyjka (C), nie występowały natomiast w wierzchołku (A). Tworzyły one charakterystyczne skupiska komórek nerwowych (od kilku do kilkudziesięciu neuronów).

Techniki barwień immunohistochemicznych umożliwiły mi stwierdzenie obecności różnych neurotransmiterów i/lub enzymów uczestniczących w procesie ich powstawania, w neuronach IG leżących w wymienionych strukturach pęcherza moczowego. Badania immunohistochemiczne wykazały, że FB+ neurony leżące zarówno w UBT- oraz UBC-IG, tworzyły trzy populacje neuronalne. Zdecydowana większość neuronów UBT- oraz UBC-IG, stanowiących odpowiednio ok. 76% i 76%, należała do grupy neuronów adrenergicznych (te które zawierały jednocześnie TH lub DBH). Neurony cholinergiczne (te, które zawierały jednocześnie CHAT lub VACHT) leżące zarówno w UBT- oraz UBC-IG, które zawierały odpowiednio ok. 22% i 20% neuronów FB+. Najmniej liczną populacją neuronalną były neurony należące do grupy neuronów tzw. NANC (nie zawierały żadnej z badanych substancji), czyli nieadrenergicznych/niecholinergicznych leżących zarówno w UBT- oraz UBC-IG, które zawierały, odpowiednio ok. 1,4% i 3,8% FB+ komórek nerwowych. Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał dla badanych neuropeptydów oraz NOS wykazały immunoreaktywność (IR) dla NPY (NPY-IR) w UBT- oraz UBC-IG,

odpowiednio w ok. 59,3% i 51,9% FB+ neuronów. Poszczególne procentowe liczebności dla SOM-IR wynosiły, odpowiednio ok. 39,9% i 39,5%, dla VIP-IR wynosiły, odpowiednio ok. 5% i 0% oraz dla NOS-IR wynosiły, odpowiednio 1,4% i 3,8% FB+ komórek nerwowych.

Za pomocą metody Western-blot, zbadano zwoje nerwowe leżące w UBT- oraz UBC-IG i stwierdzono obecność kluczowych substancji enzymatycznych dla układów regulujących funkcje pęcherza moczowego –TH/DBH – enzymy syntezy katecholamin – markerów neuronów współczulnych oraz ChAT/VACht – enzymów związanych z syntezą i transportem acetylocholino – zasadniczego neuroprzekaźnika neuronów przywspółczulnych.

Na podstawie przedstawionych powyżej wyników badań można stwierdzić, że populacje neuronów IG należały głównie do neuronów adrenergicznych oraz cholinergiczych. Z dostępnej literatury wynika, iż istnieją różnice w rozmieszczeniu zwojów śródściennych u poszczególnych gatunków zwierząt. Zwoje te są bardzo liczne u świnki morskiej, mniej liczne u kota, lisa, królika, konia oraz samicy świni. Brak, bądź bardzo nieliczne występowały u myszy i szczura (przegląd literatury w (Pidsudko 2013a)) Badania immunohistochemiczne wykazały dwie główne populacje neuronów UB-IG – 1.) neurony adrenergiczne (te immunoreaktywne dla DBH, ok 76%) oraz 2.) cholinergiczne (te immunoreaktywne dla VACht, ok. 22%). Dane te pokrywały się częściowo z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych eksperymentach przeprowadzonych przeze mnie na pęcherzach samicy świni. Tak duża koncentracja neuronów adrenergicznych w niniejszych badaniach wynikała prawdopodobnie z faktu, podobnie jak to stwierdzono u człowieka, że badane IG pochodziły z obszaru trójkąta oraz szyjki pęcherza moczowego, gdzie, szczególnie u samców, koncentracja struktur adrenergicznych była największa. W tych częściach pęcherza moczowego, struktury adrenergiczne powodują skurcz mięśni gładkich a także są odpowiedzialne za zamknięcie szyjki pęcherza, gdzie u samców, nerwy te są aktywowane podczas ejakulacji (szyjka pęcherza powinna być zamknięta), uniemożliwiając w ten sposób wsteczną ejakulację do pęcherza, co przy występujących zaburzeniach tej funkcji związane jest z problemem z płodnością u samców (szczegóły i przegląd literatury w (Pidsudko 2013a)).

Badania immunohistochemiczne wykazały też, że neurony adrenergiczne i cholinergiczne zawierały NPY oraz SOM, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami przeprowadzonymi u ludzi i innych ssaków. NPY znajduje się w zwojach śródściennych świnki morskiej, konia, jak również w cewce moczowej człowieka. SOM prawdopodobnie działa w ramach wewnątrzwojowego przewodnictwa nerwowego jako ko-transmitter lub neuromodulator i może mieć wpływ na działanie innych przekaźników (szczegóły i przegląd literatury

w (Pidsudko 2013a)).

Prezentowane wyniki badań w tej publikacji wykazały też obecność VIP w neuronach UB-IG. Dokładna rola tego peptydu w pęcherzowych strukturach nerwowych świni nie jest znana. Rozmieszczenie struktur nerwowych zawierających VIP w mięśniach gładkich, dookoła naczyń krwionośnych i w nabłonku świńskiego układu moczowego sugeruje, iż VIP może brać udział w regulacji aktywności mięśni gładkich, przepływu krwi i aktywności nabłonka (szczegóły i przegląd literatury w (Pidsudko 2013a)). W prezentowanych badaniach najmniej liczną populacją neuronów UB-IG były neurony zawierające NOS należące do populacji NANC, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami uzyskanymi przeze mnie w badaniach przeprowadzonych na pęcherzach samicy świni (szczegóły i przegląd literatury w (Pidsudko 2013a)).

Podsumowując, w publikacji tej, uzyskane wyniki ujawniły obecność wielu populacji neuronów UB-IG znajdujących się w trójkącie oraz szyjce pęcherza moczowego. Stwierdzono w neuronach tych, oprócz adrenaliny i acetylocholin, obecność wielu innych substancji biologicznie aktywnych, które mogą działać jako neuroprzekaźniki lub neuromodulatory. Ponadto, neurony te nie działają tylko jako stacje przekaźnikowe na terenie trójkąta oraz szyjki, ale są zdolne do wzajemnych złożonych interakcji działania i prawdopodobnie pełnią funkcję służącą do koordynowania i regulacji aktywności mięśni gładkich zarówno w przypadku fazy gromadzenia jak i opróżniania pęcherza moczowego.

Dokładne dane dotyczące wyników tych badań opisano i przedyskutowano w publikacji pierwszej (1. Pidsudko Z. “Immunohistochemical characteristics and distribution of neurons in the intramural ganglia supplying the urinary bladder in the male pig.” *Pol J Vet Sci* 16 (4): 629-638, 2013).

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań, zaprezentowane w **publikacji drugiej (Pidsudko 2013b)**, wykazały że neurony czuciowe zaopatrujące wszystkie badane części pęcherza moczowego (UB) samca świni (trójkąt – (T; trigone), szyjkę – Cervix, (C; czasami określa się tę strukturę jako podstawa - Base, B) i wierzchołek – Apex, (A; czasami określa się tę strukturę jako szczyt - Dome, D) znajduwane były w obustronnych zwojach rdzeniowych korzeni dogrzebietowych rdzenia kręgowego (DRG) odcinka lędźwiowego (L) oraz krzyżowego (S). Należy dodać, iż liczba neuronów w zwojach lewych (l) była mniejsza, niż w prawych (r).

W przypadku neuronów projektujących do trójkąta pęcherza moczowego (UBT-PN)

znajdowane one były w zwojach odcinka L₁-L₆ oraz S₃-S₄. W przypadku neuronów projektujących do szyjki pęcherza moczowego (UBB-PN) znajdowane one były w zwojach odcinka L₂-L₅ oraz S₃-S₄. W przypadku neuronów projektujących do wierzchołka pęcherza moczowego (UBD-PN) znajdowane one były w zwojach odcinka L₃-L₄ (niewielka liczba) oraz S₃-S₄. Neurony te reprezentowały trzy klasy wielkości. Przeważającą liczebnie populację stanowiły neurony „małe” (średnica poniżej 30 μm) i „średnie” (średnica 31-50 μm). Tylko ok. 1% neuronów stanowiły neurony „duże” (średnica powyżej 51 μm). Jednakże, należy zaznaczyć, iż większość FB+ neuronów w zwojach DRG L (ok. 56%) należała do podpopulacji komórek średnich, natomiast w zwojach DRG S (ok. 66%) należały do podpopulacji komórek małych.

Techniki barwień immunohistochemicznych umożliwiły stwierdzenie obecności różnych neurotransmiterów i/lub enzymów uczestniczących w procesie ich powstawania, w neuronach czuciowych zwojów rdzeniowych zaopatrujących wymienione struktury pęcherza moczowego. Najliczniejszą populacją neuronów FB+ zaopatrujących poszczególne struktury UB były komórki CGRP-IR. Aczkolwiek, występowały różnice dotyczące częstości występowania neuronów CGRP-IR w zwojach DRG odcinków L i S. W zwojach DRG L ok. 60% neuronów FB+ było CGRP-IR, podczas gdy w zwojach DRG S ich procentowa zawartość wahała się od ok. 25% (UBT-PN, UBB-PN) do ok. 40% (UBD-PN). FB+ SP-IR komórki nerwowe były również różnorodnie rozmieszczone w zwojach DRG L i S. Neurony te częściej występowały w zwojach DRG L (20-40%), niż w zwojach DRG S (13-24%). Innymi substancjami biologicznie aktywnymi znalezionymi w UBT-PN i UBB-PN były: NOS, GAL i SOM, aczkolwiek częstość ich występowania była znacznie niższa (mniej niż 10%). Podobne różnice w rozmieszczeniu komórek nerwowych znajdowano pomiędzy DRG L i S. W przypadku UBD-PN nie znaleziono komórek GAL- i SOM-IR leżących w DRG L i S.

Na podstawie wyników badań uzyskanych w tej publikacji można stwierdzić, że neurony czuciowe DRG zaopatrujące pęcherz moczowy były odcinkowo i niesymetrycznie rozmieszczone po obu stronach rdzenia kręgowego leżąc od odcinka L₁ do S₄, w przypadku neuronów unerwiających UBT, od L₂ do S₄, w przypadku neuronów unerwiających UBB oraz od L₃ do S₄, w przypadku neuronów zaopatrujących UBD. W dostępnej literaturze, dane dotyczące rozmieszczenia neuronów projektujących do pęcherza z DRG pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych u szczura, myszy, świnki morskiej, kota, człowieka i świni. Z badań tych wynika, że populacja neuronów czuciowych zaopatrujących pęcherz moczowy u badanych gatunków (w tym świni) podzielona została na dwa centra nerwowe. Jedno z nich

utworzone jest przez pęcherzowe neurony czuciowe zwojów DRG neuromerów piersiowo-łędźwiowych, drugie zaś zlokalizowane jest na wysokości neuromerów łędźwiowo-krzyżowych. Są to populacje heterogenne, albowiem różnią się między sobą zarówno liczebnością, jak i kodowaniem chemicznym komórek nerwowych (a co za tym idzie, rodzajem substancji transmisyjnych uwalnianych na zakończeniach ich wypustek), co wskazuje, że oba centra nerwowe mogą pełnić różne funkcje fizjologiczne (szczegóły i przegląd literatury w (Pidsudko 2013b)).

Badania immunohistochemiczne ujawniły, że większość neuronów FB+ unerwiających UBT, UBB i UBD wykazywały immunoreaktywność dla CGRP i SP. Taki fenotyp neuronów FB+ był statystycznie istotnie częściej spotykany w odcinkach łędźwiowych, niż krzyżowych DRG. Ponadto CGRP i SP może występować w zakończeniach nerwów aferentnych pęcherza, samodzielnie lub w różnych kombinacjach. Uważa się, że substancje te mogą być potencjalnymi czynnikami zapalnymi. Zmiany w ekspresji neuropeptydów obserwowane były w zwierzęcym modelu stanu zapalnego oraz w pęcherzu nadaktywnym. Z dostępnych danych literaturowych można wysunąć hipotezę, że świńskie neurony odcinka krzyżowego DRG zaopatrujące UBT, UBB i UBD spełniają funkcje prioproceptywne, a w odcinku łędźwiowym leżą neurony pełniące funkcje nocyceptywne (dokładny opis i szczegóły oraz przegląd literatury w (Pidsudko 2013b)). Struktury NOS-IR, jak wynika z badań funkcjonalnych nad strukturami czuciowymi leżącymi w DRG, mogą pełnić rolę hamującą w skurczu mięśni gładkich trójkąta, szyjki, czy też cewki moczowej (szczegóły oraz przegląd literatury w (Pidsudko 2013b)).

Podsumowując, w publikacji tej, przedstawione wyniki dostarczyły szczegółowego opisu organizacji przestrzennej oraz neurochemicznego wzoru unerwienia czuciowego pęcherza moczowego samca świni. Ponadto uzyskane rezultaty mogą być pomocne w tworzeniu morfologicznej podstawy do dalszych eksperymentów funkcjonalnych dla świńskiego modelu koncentrujących się na mechanizmach chorób o podłożu neurogennym.

Dokładne dane dotyczące wyników tych badań opisano i przedyskutowano w publikacji drugiej (2. Pidsudko Z. „Immunohistochemical characteristics and distribution of sensory dorsal root ganglia neurons supplying the urinary bladder in the male pig.” *J Mol Neurosci*, DOI 10.1007/s12031-013-0117-2, 2013).

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań, przedstawione w **publikacji trzeciej (Pidsudko 2013c)** ujawniły, że po iniekcji znacznika do poszczególnych części pęcherza moczowego (trójkąta - UBT, szyjki – UBC oraz wierzchołka – UBA) FB+ neurony

znajdywane były w zwojach pnia współczulnego – SChG, zwojach przedkręgowych – zwoju krezkowym doogonowym lub dolnym - IMG/CaMG oraz zwojach miednicznych – zwojach miednicznych przednich - APG. Przyjmując, że wszystkie badane neurony FB+ tworzyły 100%, to neurony projektujące z SChG do UBT, UBC i UBA stanowiły, odpowiednio ok 6,6%, 23,6% oraz 32,2%. Odpowiednia procentowa zawartość neuronów projektująca z IMG do UBT, UBC i UBA wynosiła, odpowiednio ok. 38,6%, 31,4% oraz 67,9%, podczas gdy dla neuronów projektujących z APG wynosiła, odpowiednio ok. 54,5%, 45% oraz 0%.

Neurony SChG unerwiały wszystkie badane struktury UB i znajdujące się w obustronnych zwojach pnia współczulnego odcinka L oraz S. Należy dodać, iż liczba neuronów w zwojach lewych (l) była mniejsza, niż w prawych (r).

W przypadku neuronów UBT-PN znajdowane one były w zwojach SChG odcinka L₁-L₆ oraz S₁-S₄. W przypadku neuronów SChG projektujących do UBC-PN znajdowane one były w zwojach odcinka L₃-L₆ oraz S₁-S₄. W przypadku neuronów projektujących UBA-PN znajdowane one były w zwojach odcinka L₆ oraz S₁-S₄.

Zwoje IMG samców świni również zawierały neurony projektujące do UBT-PN, UBC-PN i UBA-PN, które rozmieszczone były obustronnie, zarówno w lewych, jak i prawych zwojach. Jednakże i tu obserwowano wyraźne różnice w ich liczebności pomiędzy zwojami lewymi a prawymi. W przypadku IMG UBT-PN, neurony te układały się jako długie pasmo leżące wzdłuż całej długości zwoju, przy jego bocznej granicy, dodatkowo, małe skupisko tych komórek nerwowych układało się zawsze w okolicy odejścia od zwoju nerwów okężniczych doogonowych - NCC. Tak ułożone neurony mogą być uważane, jako „centrum trójkąta pęcherza moczowego”. W przypadku IMG UBC-PN, neurony te układały się tylko jako długie pasmo leżące wzdłuż całej długości zwoju, przy jego bocznej granicy. W ten sposób ułożone neurony mogą być również uważane jako „centrum szyjki pęcherza moczowego”. W przypadku IMG UBA-PN, neurony te układały się nieregularnie na obszarze całego zwoju.

Także zwoje APG samców świni zawierały neurony projektujące do UBT-PN i UBC-PN, które rozmieszczone były obustronnie, zarówno w lewych, jak i prawych zwojach. Jednakże i tu obserwowano wyraźne różnice w ich liczebności pomiędzy zwojami l, a r. Nie stwierdzono neuronów FB+ w APG projektujących do UBA.

W przypadku APG UBT-PN, neurony układały się regularnie wzdłuż całego obszaru zwoju. Należy dodać, iż można było zauważyć ich koncentrację w okolicy odejścia włókien nerwowych biegnących do gruczołów pęcherzykowych oraz szyjki i trójkąta UB. W przypadku APG UBC-PN, neurony układały się regularnie wzdłuż całego obszaru zwoju.

Należy dodać, iż podobnie można było zauważyć ich koncentrację w okolicy odejścia włókien nerwowych biegnących do pęcherzyków nasiennych oraz szyjki i trójkąta UB.

Badania immunohistochemiczne wykazały, że FB+ neurony APG UBT-PN oraz UBC-PN, tworzyły trzy główne populacje neuronalne. Niemalże połowa neuronów UBT-PN oraz UBC-PN, stanowiących odpowiednio ok. 45% i 54%, należała do grupy neuronów adrenergicznych (te, które zawierały jednocześnie TH lub DBH). Neurony cholinergiczne (te, które zawierały jednocześnie CHAT lub VAcHT) projektujące do UBT-PN oraz UBC-PN, zawierały, odpowiednio ok. 53% i 44% neuronów FB+. Najmniej liczną populacją neuronalną UBT-PN oraz UBC-PN, były neurony należące do grupy neuronów tzw. NANC (nie zawierały żadnej z badanych substancji), czyli nieadrenergicznych/niecholinergicznych, które zawierały, odpowiednio ok. 1,8% i 1,6% FB+ komórek nerwowych. Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał dla badanych neuropeptydów ujawniły IR dla NPY, odpowiednio w ok. 20,8% i 22% FB+ neuronów w populacji UBT-PN oraz UBC-PN. Poszczególne liczby procentowej zawartości dla SOM-IR wynosiły, odpowiednio ok. 16,6% i 10%, dla GAL-IR wynosiły, odpowiednio ok. 1% i 0,5% oraz tych dla VIP-IR wynosiły odpowiednio 4% i 0% FB+ komórek nerwowych. Nie stwierdzono obecności populacji neuronów FB+ UBT-PN i UBC-PN zawierających CGRP i SP.

Badania immunohistochemiczne zwojów IMG ujawniły, że i w tym przypadku FB+ neurony IMG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN tworzyły trzy główne populacje neuronalne. Zdecydowana większość neuronów IMG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN stanowiących, odpowiednio ok. 80,5%, 81% i 79,7 % należała do grupy neuronów adrenergicznych. Neurony cholinergiczne w IMG projektujące do UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN zawierały, odpowiednio ok. 3%, 4% i 3,8% neuronów FB+ i była to populacja najmniej liczna. Drugą populacją neuronalną w IMG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN były neurony należące do grupy neuronów tzw. NANC, czyli nieadrenergicznych/niecholinergicznych, które zawierały, odpowiednio ok. 10%, 12% i 14% FB+ komórek nerwowych. Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał dla badanych neuropeptydów i NOS ujawniły że neurony NPY-IR, były obecne w populacji neuronów IMG UBT-PN, UBC-PN i UBA-PN, odpowiednio w ok. 49%, 27,5% i 21% FB+ komórek. Poszczególne liczby procentowej zawartości dla SOM-IR wynosiły, odpowiednio ok. 11%, 21% i 21%, dla GAL-IR wynosiły, odpowiednio ok. 5%, 4% i 0%, dla VIP-IR wynosiły, odpowiednio ok. 1%, 0% i 0% oraz tych dla NOS wynosiły, odpowiednio ok. 5%, 5% i 0% FB+ komórek nerwowych. Nie stwierdzono obecności populacji neuronów FB+ w UBT-PN, UBC i UBA-PN zawierających CGRP i SP.

Badania immunohistochemiczne zwojów SChG ujawniły natomiast, że FB+ neurony SChG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN tworzyły dwie główne populacje neuronalne. Zdecydowana większość neuronów SChG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN stanowiących, odpowiednio ok. 90%, 90% i 91% należała do grupy neuronów adrenergicznych. Co więcej, w drugiej populacji neuronalnej w SChG UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN znalazły się neurony należące do grupy neuronów tzw. NANC, czyli nieadrenergicznych/niecholinergicznym, które zawierały, odpowiednio ok. 10%, 10% i 9% FB+ komórek nerwowych. Tylko pojedyncze neurony w SChG projektujące do UBT-PN, UBC-PN oraz UBA-PN były cholinergiczne. Barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał dla badanych neuropeptydów ujawniły że neurony NPY-IR, były obecne w populacji neuronów SChG UBT-PN, UBC-PN i UBA-PN, odpowiednio w ok. 45%, 44% i 45% FB+ komórek. Poszczególne procentowe liczebności dla GAL-IR wynosiły, odpowiednio ok. 8%, 5% i 0% FB+ komórek nerwowych.

Za pomocą metody Western-blot, zbadano ekstrakty białkowe pochodzące ze zwojów SChG, IMG oraz APG i stwierdzono obecność kluczowych substancji enzymatycznych dla układów regulujących funkcje pęcherza moczowego –TH/DBH – enzymy syntezy katecholamin – markerów neuronów współczulnych oraz ChAT/VACHT – enzymów związanych z syntezą i transportem acetylocholiny – zasadniczego neuroprzekaźnika neuronów przywspółczulnych.

W publikacji tej, na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że neurony autonomiczne unerwiające pęcherz moczowy były rozmieszczone w zwojach SChG, IMG oraz APG w sposób segmentowy i asymetryczny. Zastosowanie iniekcji znacznika wstecznego FB do UB ujawniło, że źródłem pochodzenia neuronów autonomicznych unerwiających UBT i UBC samczego świńskiego UB, są neurony leżące, niemalże w równej proporcji, w zwojach przy- i przedkręgowych (łącznie ok. 50,5%) oraz w zwojach miednicznych (ok. 49,5%), podczas gdy takie neurony unerwiające UBA były położone tylko w zwojach SChG i IMG. W przeciwieństwie do prezentowanych wyników, u szczura źródłem pochodzenia neuronów autonomicznych zaopatrujących UB są neurony leżące w zwojach SChG i IMG, natomiast tylko niewielka ilość komórek nerwowych unerwiających tę strukturę była obecna w zwojach miednicznych. U szczura np. tylko 1% neuronów projektujących z zwoju miednicznego wielkiego – MPG unerwiało wierzchołek, podczas gdy 10% komórek nerwowych unerwiało szyjkę UB (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)). Należy zaznaczyć, iż samczy, świński APG (odpowiednik szczurzego MPG) zawierał prawie 50% wszystkich neuronów wyznakowanych FB, a neurony te stanowiły jedne z głównych źródeł

zaopatrzenia nerwowego samczego UB świni (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Następnym źródłem pochodzenia neuronów autonomicznych unerwiających UB, są neurony leżące w zwojach IMG, które zawierały ok. 40% FB+ neuronów projektujących do UBT, ok. 30% do UBC oraz ok. 67% do UBA. Te zwoje przedkręgowce charakteryzowały się niezwykle wysokim poziomem swoistości unerwienia pęcherza. W przeciwieństwie do wyników tych badań, np. szczurzy IMG charakteryzował się tym, iż neurony z tego zwoju projektowały głównie do wierzchołka pęcherza (ok. 22% komórek z współczulnego unerwienia tej części) w porównaniu do 1% neuronów unerwiających szyjkę. Należy również podkreślić, iż IMG jest takim zwojem, który bierze udział w unerwieniu różnych innych narządów układu moczowo-płciowego. Badania z użyciem znacznika wstecznego w celu wykazania źródeł unerwienia takich narządów jak: gruczoły opuszkowo-cewkowe, nasieniowód, gruczoł pęcherzykowy, czy też jądro, pokazały obecność komórek FB+ w zwojach IMG samców świni. U samicy świni zwoje te są źródłem zaopatrzenia nerwowego jajników, jajowodów, macicy, czy trójkąta UB (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)). We wszystkich wspomnianych przeze mnie badaniach neurony FB+ leżały w ściśle określonych, odrębnych częściach zwojów IMG (układały się w mniej lub bardziej charakterystyczne pasma wzdłuż bocznej granicy zwoju z większym ich nagromadzeniem w częściach doczaszkowych i doogonowych zwoju). Podobny układ ułożenia neuronów obserwowany był w prezentowanych badaniach. Na podstawie uzyskanych rezultatów, we wspomnianych powyżej badaniach nad unerwieniem narządów układu moczowo-płciowego świni można wysnuć hipotezę, iż neurony w zwojach IMG układają się tworząc swoiste „centrum moczowo-płciowe”.

Innym źródłem pochodzenia neuronów autonomicznych unerwiających UB są neurony położone w zwojach SChG. Zwoje te zawierały ok. 7% FB+ neuronów projektujących do UBT, 24% do UBC i 32% do UBA (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Przeprowadzone badania immunohistochemiczne ujawniły, że główną populacją neuronalną w SChG są neurony adrenergiczne (te immunoreaktywne dla TH/DBH; ok. 90%). Neurony te zawierały również NPY i GAL. Obserwacje te są zgodne z danymi uzyskanymi we wcześniejszych eksperymentach przeprowadzonych na organizmach innych ssaków, a które pokazywały, że większość neuronów SChG jest immunoreaktywna dla TH i DBH (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Immunohistochemiczna charakterystyka neuronów IMG (ok. 80%) zaopatrujących UB wykazała, że zdecydowanie największą populacją neuronalną były komórki noradrenergiczne w swojej naturze (barwiły się też dla TH/DBH – kluczowych enzymów dla syntezy

noradrenaliny w zakończeniach nerwowych). Neurony te zawierały również NPY, SOM i GAL. Obserwacje te są zgodne z uzyskanymi wynikami w badaniach, które przeprowadzono na innych gatunkach zwierząt, oraz które przeprowadziłem we wcześniejszym badaniu zwojów IMG u lochy (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Obecne badania ujawniły także, że mała populacja neuronów IMG projektująca do UB była cholinergiczna. Neurony FB+ zawierały również NPY, SOM lub VIP. Należy nadmienić, że badanie te ujawniły także obecność neuronów tworzących populacje NANC FB+ (zawierały głównie NOS) komórek nerwowych. Wiadomym jest, że tlenek azotu NO może działać jako substancja przekaźnikowa i należy do grupy przekaźników hamujących nieadrenergicznych, niecholinergicznym (dokładny opis i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Immunohistochemiczna charakterystyka neuronów APG zaopatrujących UB pozwoliła mi wyróżnić trzy podpopulacje neuronalne zwojów miednicznych: neurony adrenergiczne (TH/DBH-pozytywne), neurony cholinergiczne (VACHT/ChAT-pozytywne) oraz neurony NANC. Neurony zwojowe w APG charakteryzują się ogromną różnorodnością kodowania chemicznego. Ma to związek po części z tym, iż w zwoju tym krzyżują się drogi nerwowe układu współczulnego oraz przywspółczulnego, a neurony posiadają różnorodną zawartość substancji przekaźnikowych (mogą być adrenergiczne, bądź cholinergiczne, mogą zawierać oba rodzaje substancji charakterystycznych dla tych typów neuronów wraz z zawartością neuropeptydów, bądź nie zawierać żadnej z tych substancji).

W prezentowanych badaniach stwierdzono także, że neurony APG zaopatrujące UB zawierają TH/DBH. Neurony te mogą być jednocześnie immunoreaktywne dla NPY, SOM lub GAL. Np., u samca szczura wykazano, że NPY występował we wszystkich neuronach współczulnych i przywspółczulnych unerwiających UB lub prostnicę, a bardzo mało było neuronów zawierających VIP. U samców świnki morskiej, np. 40% neuronów zwojów miednicznych unerwiających nasieniowód, gruczoł pęcherzykowy i prostatę wykazywało obecność TH-IR (dokładny opis, szczegóły i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Przedstawiane badania ujawniły również, że drugą dużą populacją neuronów APG zaopatrujących UB są komórki nerwowe zawierające VACHT. Neurony te wykazywały jednocześnie immunoreaktywność dla NPY, SOM lub VIP. Np. 26% neuronów MPG szczura zaopatrujących nasieniowód wykazywały IR dla VIP a 4% tych neuronów zawierało NPY. NPY, VIP i SOM odpowiadają prawdopodobnie za skurcz naczyń krwionośnych i występują w zakończeniach nerwowych zaopatrujących te struktury u różnych gatunków ssaków. Neurony APG NPY-IR, VIP-IR lub SOM-IR ujawnione w prezentowanych badaniach spełniają przypuszczalnie podobne funkcje w zakończeniach nerwowych zaopatrujących

naczynia krwionośne występujące w pęcherzach świńskich (dokładny opis, szczegóły i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Reasumując, należy podkreślić, iż neurony zwojów miednicznych wykazują dymorfizm płciowy zaopatrując wiele narządów, i co nie jest zaskoczeniem, będą występowały zależne od płci różnice w morfologii tych zwojów. Jednym z oczywistych przykładów dotyczących tych różnic są noradrenergiczne neurony współczulne, które u samców szczura zawierają jedną trzecią neuronów zwojów miednicznych, podczas gdy, w przypadku samic zawierają tylko małą część (ok. 5-10%) (dokładny opis, szczegóły i literatura w (Pidsudko 2013c)).

Są to pierwsze tak kompleksowe badania zajmujące się kodowaniem chemicznym i dystrybucją autonomicznych neuronów zaopatrujących pęcherz moczowy samca świni. Podsumowując, neurony projektujące do UB można znaleźć w niektórych obustronnych zwojach SChG, IMG i APG. Jednakże, stwierdzano różnice w liczbie tych komórek nerwowych obserwowanych zarówno po stronie prawej, jak i lewej. Badania immunochemiczne wykazały, że zdecydowana większość IMG i SChG projektujących z UB neuronów zawierało TH i DBH oraz niektóre inne neuropeptydy, jak NPY, SOM i GAL. Zostały wyróżnione trzy subpopulacje neuronów APG zaopatrujących UB: neurony adrenergiczne, które jednocześnie zawierały NPY-, SOM- i/lub GAL-IR, neuronów cholinergicznych, które jednocześnie zawierały NPY, SOM, VIP, oraz neurony NANC.

Dokładne dane dotyczące wyników tych badań opisano i przedyskutowano w publikacji trzeciej (3. Pidsudko Z., “**Immunohistochemical characteristics and distribution of neurons in the paravertebral, prevertebral and pelvic ganglia supplying the urinary bladder in the male pig**” *J Mol Neurosci*, DOI 10.1007/s12031-013-0139-9, 2013).

PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Badania z użyciem wstecznego znacznika neuronów pozwoliły na zlokalizowanie obwodowych komórek nerwowych włączonych w unerwienie poszczególnych części pęcherza moczowego samca świni domowej. Neurony zaopatrujące trójkąt, szyjkę i wierzchołek pęcherza moczowego występowały w zwojach śródściennych - IG ściany tego narządu (nie występowały w wierzchołku), w zwojach czuciowych korzeni dogrzbietowych rdzenia kręgowego - DRG, w zwojach pnia współczulnego - SChG, w zwojach przedkręgowych – zwojach kręzkowych dolnych (tylnych) IMG (CaMG), jak

również w zwojach miednicznych – zwojach miednicznych przednich (oprócz wierzchołka) - APG.

2. Wykazano, że populacja neuronów czuciowych zwojów DRG zaopatrujących poszczególne części pęcherza moczowego u samca świni podzielona została na dwa centra nerwowe. Jedno z nich utworzone było przez pęcherzowe neurony czuciowe zwojów DRG neuromerów lędźwiowych, drugie zaś zlokalizowane było na wysokości neuromerów krzyżowych. Neurony te zawierają różne substancje biologicznie aktywne takie jak: CGRP, SP, NOS, GAL i SOM. Są to populacje heterogenne, albowiem różnią się między sobą zarówno liczebnością, jak i kodowaniem chemicznym komórek nerwowych (a co za tym idzie, rodzajem substancji transmisyjnych uwalnianych na zakończeniach ich wypustek), co wskazuje, że oba centra nerwowe mogą pełnić różne funkcje fizjologiczne.

3. Neurony IMG zaopatrujące trójkąt oraz szyjkę pęcherza moczowego ułożone były w sposób uporządkowany, tworząc wyraźne „centrum pęcherzowe”. Zjawisko to potwierdziło sugerowane już wcześniej istnienie wewnątrzwojowych ośrodków nerwowych związanych z regulacją czynności poszczególnych narządów jamy brzusznej i miednicznej świni.

4. Przeprowadzone badania immunohistochemiczne wykazały, iż neurony SChG unerwiające poszczególne części pęcherza moczowego należały do dwóch grup populacji neuronalnych: adrenergicznej (najliczniejszej), które zawierały też neuropeptydy: NPY i GAL oraz nieadrenergicznej/niecholinergiczej.

5. Przeprowadzone badania immunohistochemiczne wykazały, iż neurony IMG unerwiające poszczególne części pęcherza moczowego należały do trzech grup populacji neuronalnych: adrenergicznej (najliczniejszej), które zawierały też neuropeptydy: NPY, SOM i GAL, nieadrenergicznej/niecholinergiczej, które zawierały NOS oraz cholinergiczej (najmniej licznej), które zawierały również neuropeptydy: NPY, SOM i VIP.

6. Przeprowadzone badania immunohistochemiczne wykazały, iż neurony APG unerwiające poszczególne części pęcherza moczowego należały do trzech grup populacji neuronalnych: adrenergicznej, które zawierały też neuropeptydy: NPY, SOM i GAL, cholinergiczej, które zawierały również neuropeptydy: NPY, SOM i VIP oraz nieadrenergicznej/niecholinergiczej (najmniej licznej), które zawierały NOS.

7. Wyniki niniejszych badań będą więc stanowić niezbędną podstawę do lepszego zrozumienia procesów o charakterze fizjologicznym, farmakologicznym i klinicznym, mających na celu wyjaśnienie szeregu zagadnień z zakresu roli substancji biologicznie aktywnych w regulacji nerwowej pęcherza moczowego. Mogą być również wykorzystane

w przyszłości przez przemysł farmaceutyczny – związane jest to z dużym podobieństwem badanego gatunku do organizmu ludzkiego. Dodatkowo organizm świni poprzez swoje podobieństwo do organizmu człowieka, może być doskonałym modelem doświadczalnym, do badania i poszerzenia wiedzy na temat jednostek chorobowych ludzi i przez to umożliwić odpowiednie udoskonalenie metod leczenia.

Piśmiennictwo

- Brading AF (1999) The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol* 84:215-221
- Crowe R, Burnstock G (1989) A histochemical and immunohistochemical study of the autonomic innervation of the lower urinary tract of the female pig. Is the pig a good model for the human bladder and urethra? *J Urol* 141:414-422
- De Groat WC, Booth AM, Yoshimura N (1993) Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In: Maggi CA (ed) *Nervous control of the urogenital system*. Harwood Academic Publ., Chur, Switzerland, pp. 227-290
- De Groat WC, Steers WD (1990) Autonomic regulation of the urinary bladder and sexual organs. In: Loewy E.A., Spyer K.A. edyt. *Central regulation of autonomic functions*. N.Y., Oxford, pp. 310-333
- Dixon JS, Jen PY, Gosling JA The distribution of vesicular acetylcholine transporter in the human male genitourinary organs and its co-localization with neuropeptide Y and nitric oxide synt.
- Drake MJ, Hedlund P, Mills IW, McCoy R, McMurray G, Gardner BP, Andersson KE, Brading AF (2000) Structural and functional denervation of human detrusor after spinal cord injury. *Lab Invest* 80:1491-1499
- Fitzgerald MP, Link CL, Litman HJ, Trivison TG, McKinlay JB (2007) Beyond the lower urinary tract: the association of urologic and sexual symptoms with common illnesses. *Eur Urol* 52:407-415
- Gibbins IL (1982) Lack of correlation between ultrastructural and pharmacological types of non-adrenergic autonomic nerves. *Cell Tissue Res* 221:551-581
- Greenwood D, Coggeshall RE, Hulsebosch CE (1985) Sexual dimorphism in the numbers of neurons in the pelvic ganglia of adult rats. *Brain Res* 340:160-162
- Kaleczyc J (1997) Neurony splotu miednicznego samca świni - organizacja przestrzenna oraz immunohistochemiczna charakterystyka ze szczególnym uwzględnieniem neuronów zaopatrujących nasieniowód. Praca habilitacyjna. *Acta Acad Agricult Tech Olst Veterinaria* 24 (Suppl A)
- Kaleczyc J, Majewski M, Mayer B. Sex-dependent differences in the occurrence, distribution and chemical coding of nitric oxide synthase-containing neurons in the porcine caudal mesenteric ganglion. *Verh Anat Ges* 89: 77. 1994.
- Ref Type: Conference Proceeding

- Kaleczyc J, Scheuermann DW, Pidsudko Z, Majewski M, Lakomy M, Timmermans JP (2002) Distribution, immunohistochemical characteristics and nerve pathways of primary sensory neurons supplying the porcine vas deferens. *Cell Tissue Res* 310:9-17
- Majewski M (1997) Afferentne i efferentne unerwienie jajnika świni - źródła, pochodzenie i kodowanie chemiczne. Praca habilitacyjna. *Acta Acad Agricult Tech Olst Veterinaria* 24, Suppl B 554:
- Mitchell BS, Ahmed E, Stauber VV (1993) Projections of the guinea-pig paracervical ganglion to pelvic viscera. *Histochem J* 25:51-56
- Mohammed HA, Santer RM (2002) Distribution and changes with age of calcitonin gene-related peptide- and substance P-immunoreactive nerves of the rat urinary bladder and lumbosacral sensory neurons. *Eur J Morphol* 40:293-301
- Morrison J, Birder L, Craggs M, De Groat WC, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K (2005) Neural control. In: *Incontinence*. Jersey: Health Publications, Ltd.,
- Moss HE, Tansey EM, Milner P, Lincoln J, Burnstock G (1990) Neuropeptide immunoreactivity and choline acetyltransferase activity in the mouse urinary bladder following inoculation with Semliki Forest Virus. *J Auton Nerv Syst* 31:47-56
- Persson K, Alm P, Johansson K, Larsson B, Andersson KE (1995) Co-existence of nitrergic, peptidergic and acetylcholine esterase-positive nerves in the pig lower urinary tract. *J Auton Nerv Syst* 52:225-236
- Pidsudko Z. Distribution and chemical coding of neurons in the porcine inferior mesenteric ganglion projecting to the urinary bladder trigone. 56. 2000. ASGBI/AG/NAV Tripartite Meeting St John's College Cambridge.
Ref Type: Conference Proceeding
- Pidsudko Z (2004) Distribution and chemical coding of neurons in intramural ganglia of the porcine urinary bladder trigone. *Folia Histochem Cytobiol* 42:3-11
- Pidsudko Z (2013a) Immunohistochemical characteristics and distribution of neurons in the intramural ganglia supplying the urinary bladder in the male pig. *Pol J Vet Sci* 16:629-638
- Pidsudko Z (2013b) Immunohistochemical Characteristics and Distribution of Sensory Dorsal Root Ganglia Neurons Supplying the Urinary Bladder in the Male Pig. *J Mol Neurosci* DOI 10.1007/s12031-013-0117-2
- Pidsudko Z (2013c) Immunohistochemical Characteristics and Distribution of Neurons in the Paravertebral, Prevertebral and Pelvic Ganglia Supplying the Urinary Bladder in the Male Pig. *J Mol Neurosci* DOI 10.1007/s12031-013-0139-9
- Prieto D, Benedito S, Rivera L, Hernandez M, Garcia SA (1990) Autonomic innervation of the equine urinary bladder. *Anat Histol Embryol* 19:276-287
- Smet PJ, Edyvane KA, Jonavicius J, Marshall VR (1996) Neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes in intrinsic neurons of the human urinary bladder. *J Neurocytol* 25:112-124
- Stief CG, Benard F, Bosch RJ, Aboseif SR, Lue TF, Tanagho EA (1990) A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis. *J Urol* 143:392-397

- Swindle MM, Moody DC, Phillips LD (1992) Swine as a models in biomedical research. Ames: Iowa State Univ Press
- Vera PL, Nadelhaft I (1992) Afferent and sympathetic innervation of the dome and the base of the urinary bladder of the female rat. *Brain Res Bull* 29:651-658
- Wakabayashi Y, Kojima Y, Makiura Y, Tomoyoshi T, Maeda T (1995) Acetylcholinesterase-positive afferent axons in mucosa of urinary bladder of adult cats: retrograde tracing and degeneration studies. *Histol Histopathol* 10:523-530
- Warburton AL, Santer RM (1994) Sympathetic and sensory innervation of the urinary tract in young adult and aged rats: a semi-quantitative histochemical and immunohistochemical study. *Histochem J* 26:127-133
- Wasowicz K (2003) Uterus-innervating neurones in porcine inferior mesenteric ganglion: an immunohistochemical characteristic. *Anat Histol Embryol* 32:154-160
- Yoshimura N, De Groat WC (1999) Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci* 19:4644-4653
- Zhou Y, Ling EA (1998) Colocalization of nitric oxide synthase and some neurotransmitters in the intramural ganglia of the guinea pig urinary bladder. *J Comp Neurol* 394:496-505
- Zvarova K, Murray E, Vizzard MA (2004) Changes in galanin immunoreactivity in rat lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 475:590-603

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Jestem autorem lub współautorem łącznie **108** publikacji naukowych, na które składa się **27** publikacji oryginalnych, z których niemalże wszystkie (**26**) opublikowane zostały w czasopismach „Listy Filadelfijskiej” ISI, a pozostała **1** w innym czasopiśmie krajowym. Pozostałe publikacje naukowe to **81** komunikatów naukowych, prezentowanych zarówno na zjazdach krajowych (**28**), jak i zagranicznych (**44**). Sumaryczna wartość **IF** wszystkich moich oryginalnych prac naukowych, liczona według roku publikacji, wynosi **29,704**, zaś przeliczona zgodnie z rokiem bieżącym jest równa **36,618**. Liczba punktów przyznawanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jaką uzyskałem za publikację prac oryginalnych, liczoną według rankingu za rok 2012, wynosi **510** pkt., (za rok 2013, wynosi **534** pkt.) z czego **505** pochodzi z publikacji w czasopismach wyróżnionych w Journal Citation Reports (JCR). Indeks cytowań moich oryginalnych prac naukowych według bazy *Web of Science* wynosi **150** zaś indeks Hirscha (h-index) – **7**, zaś według bazy *Scopus* indeks cytowań wynosi **164** a indeks Hirscha (h-index) – **8**.

5.1 Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych

Pierwsze doświadczenia w pracy naukowej zdobywałem po zatrudnieniu mnie na stanowisku studenta asystenta-stażysty pod kierownictwem prof. dr hab. Mirosława Łakomego. Mój dorobek naukowy poprzedzający uzyskanie stopnia naukowego doktora obejmuje 2 oryginalne prace badawcze oraz 29 doniesień kongresowych. Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się na zagadnieniach związanych z szeroko rozumianą neuroanatomią, i obejmowały badania obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego, badania rozwojowe układu nerwowego, badania źródeł pochodzenia nerwów zaopatrujących narządy wewnętrzne, badania unerwienia narządów w warunkach fizjologicznych jak też w warunkach zmienionym stanem chorobowym. Wszystkie moje zainteresowania wymienione dotyczyły więc badań nad organizacją neurochemiczną oraz plastycznością neuronalną poszczególnych składowych obwodowego układu nerwowego włączonych w regulację funkcji narządów wewnętrznych zwierząt domowych.

Jednym z kierunków badań, w których uczestniczyłem dotyczył unerwienia żeńskich narządów rozrodczych świni. Dane te zawarto w publikacji oryginalnej nr **A 1.1** oraz w licznych innych publikacjach naukowych (komunikaty naukowe nr: **A 2.1, A 2.2, A 2.3, A 2.4, A 2.5, A 2.6, A 2.7, A 2.8, A 2.10, A. 2.11, A 2.13, A 2.14, A 2.15**). Opisano w nich zarówno rozmieszczenie, jak i chemiczne kodowanie komórek oraz włókien nerwowych unerwiających te narządy. W pracach tych stosowano kombinację technik wstecznego znakowania neuronów unerwiających jajnik, jajowód oraz podwójnych barwień immunofluorescencyjnych w celu zbadania źródła pochodzenia włókien nerwowych oraz neurochemicznego kodowania, zarówno wyznakowanych perikarionów, jak i zakończeń nerwowych w danym narządzie. Wspomniane prace były doniesieniami o występowaniu substancji biologicznie aktywnych w neuronach zaopatrujących żeńskie narządy rozrodcze zwierząt hodowlanych, a opisywały neurochemiczny charakter unerwienia żeńskich narządów rozrodczych świni.

Kolejnym tematem badawczym, którym zajmowałem się było unerwienie jelit. Wyniki tych badań zawarto w komunikatach naukowych nr: **A 2.9, A 2.12, A 2.16, A 2.21**. Dane te obejmowały zlokalizowanie i ujawnienie chemicznego kodowania neuronów autonomicznych i czuciowych włączonych w regulację funkcji jelita grubego świni.

Następnie uczestniczyłem w badaniach dotyczących ustalenia źródeł zaopatrzenia

nerwowego jednego z gruczołów wydzielania wewnętrznego świni jakim są nadnercza, a także brałem udział w badaniach dotyczących ustalenia wzoru unerwienia oraz dystrybucji przedzwojowych neuronów współczulnych zaopatrujących zwój kręzkowy tylny (IMG; dane zawarte w komunikacie naukowym nr **A 2.19.**).

Moje zainteresowania dotyczyły również unerwienia męskich narządów rozrodczych, gdzie efekty tych badań zostały zawarte w publikacji oryginalnej nr **A 1.2** oraz komunikatach naukowych nr: **A 2.17, A. 2.20, A 2.23, A 2.24, A 2.25, A. 2.27, A 2.28, A 2.29**. Wyniki tych prac dotyczyły między innymi wpływu kastracji hormonalnej (po podaniu zwierzętom analogu GnRH jako antygeny) na unerwienie narządów płciowych samca świni, a zawarte w nich informacje będą mogły zostać wykorzystane np., przy opracowywaniu odpowiedniego preparatu do zastosowania w praktyce. Prace te dotyczyły także kodowania chemicznego komórek oraz włókien nerwowych zaopatrujących nasieniowód samca świni.

Ostatecznie zająłem się badaniami nad obecnością i wzorami współwystępowania substancji biologicznie aktywnych w neuronach autonomicznych i czuciowych zaopatrujących **pęcherz moczowy** samicy świni oraz zdolności tych neuronów do reakcji plastycznych. Dane te zawarte zostały w komunikatach naukowych nr: **A 2.18. A 2.22, A 2.26**. Zakończeniem tego etapu moich badań naukowych było uzyskanie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie stopnia doktora nauk weterynaryjnych na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów zwoju kręzkowego tylnego zaopatrujących trójkąt pęcherza moczowego”, której promotorem był prof. dr hab. Mariusz Majewski.

5.2 Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora obejmuje **25** oryginalnych prac badawczych (dodatkowo **1** została przyjęta do druku, ale nie posiada jeszcze nr DOI; została wykazana w wykazie, ale nie uwzględniałem jej w ewaluacji), w tym **24** w czasopismach uwzględnionych na Liście Filadelfijskiej (**11** w czasopismach zagranicznych i **14** w czasopismach krajowych) oraz **1** oryginalna publikacja umieszczona w innych czasopismach. Efektem mojej pracy badawczej w okresie tym, było także przygotowanie **49** komunikatów naukowych, prezentowanych zarówno na krajowych, jak i zagranicznych zjazdach.

5.2.1 Główne tematy badawcze:

Moje dotychczasowe zainteresowania naukowe były kontynuowane i dotyczyły unerwienia autonomicznego i czuciowego narządów wewnętrznych, głównie układu moczopłciowego oraz pokarmowego zwierząt domowych. Interesowały mnie zasadniczo trzy aspekty tego zagadnienia:

- 1.) źródła pochodzenia włókien nerwowych,
- 2.) neurochemiczne cechy neuronów (zarówno perykarionów jak i ich wypustek) zaopatrujących wspomniane narządy, oraz
- 3.) zmiany adaptacyjne wspomnianych neuronów do warunków fizjologicznych i patologicznych (plastyczność neuronów).

Zajmowałem się także neurochemiczną organizacją autonomicznych i czuciowych zwojów nerwowych oraz, choć w mniejszym stopniu, chemicznym kodowaniem struktur centralnego układu nerwowego, włączonych w regulację funkcji układu rozrodczego. W badaniach posługiwałem się najnowocześniejszymi metodami - histo- i immunohistochemicznymi, techniką wstecznego (retrogradowego) znakowania neuronów, mikroskopią konfokalną oraz metodami biologii molekularnej. Dotyczyły one przede wszystkim świni - zwierzęcia, którego znaczenie hodowlane jest nadal bardzo duże, a którego znaczenie jako zwierzęcia eksperymentalnego, chyba najbardziej optymalnego w badaniach biomedycznych, ciągle wzrasta. Część badań dotyczyła również człowieka, gdzie oprócz badań nad rodzajem zmian w układzie nerwowym zachodzących w przebiegu chorób nowotworowych, badałem także wpływ zmiennego pulsacyjnego pola magnetycznego na funkcje ręki i chód w przebiegu stwardnienia rozsianego.

W związku z powyższym moja działalność naukowa obejmowała następujące tematy badawcze:

5.2.1.1 Unerwienie narządów wewnętrznych zwierząt domowych i człowieka

A. Unerwienie męskich narządów płciowych: (*publikacje oryginalne nr: B 1.3, B 1.4. oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.2, B 2.5, B 2.8*).

Wymienione publikacje dotyczyły kodowania chemicznego włókien nerwowych zaopatrujących **gruczoły płciowe dodatkowe** (B 1.3) i **nasieniowód** (B 1.4, B 2.2, B 2.8) świni. Prace te w większości były doniesieniami o występowaniu wielu substancji

biologicznie aktywnych w nerwach zaopatrujących męskie narządy płciowe zwierząt hodowlanych. Dotyczyły też wpływu kastracji hormonalnej (po podaniu zwierzętom analogu GnRH jako antygeny) na unerwienie narządów płciowych samca świni, a zawarte w nich informacje będą mogły np. zostać wykorzystane przy opracowywaniu odpowiedniego preparatu do zastosowania w praktyce.

B. Unerwienie żeńskich narządów płciowych: (publikacja oryginalna nr B 1.2)

Powyższa publikacja dotyczyła eferentnego (odśrodkowego) unerwienia jajowodu świni. Opisano tu lokalizacje neuronów zaopatrujących ten narząd.

C. Unerwienie jelit, żołądka i dużych gruczołów zaściennych oraz plastyczność neuronów: (publikacje oryginalne nr: B 1.1, B 1.6, B 1.7, B 1.10, B 1.11, B 1.12, B 1.13, B 1.14, B 1.15, B 1.17, B 1.19, B 1.21, B 1.26 oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.11, B 2.15, B 2.16, B 2.20, B 2.22, B 2.23, B 2.24, B 2.25, B 2.26, B 2.27, B 2.28, B 2.30, B 2.33, B 2.35, B 2.45)

Ważną i bardzo obszerną część mojej pracy naukowej stanowiły badania dotyczące określenia wzorów unerwienia narządów układu pokarmowego a także zlokalizowanie i ujawnienie kodowania chemicznego neuronów autonomicznych i czuciowych włączonych w regulację funkcji żołądka oraz jelita cienkiego i grubego świni oraz dużych gruczołów zaściennych. W badaniach tych między innymi określiłem, bądź też brałem udział w określeniu rozmieszczenia i kodowania chemicznego neuronów autonomicznych zaopatrujących okrężnicę i prostatę świni (B 1.1), neuronów autonomicznych zaopatrujących trzustkę (B 2.33, B 2.35) oraz neuronów zaopatrujących żołądek świni (B 1.21). W zakresie badań podjęto także próbę oceny rodzaju zmian adaptacyjnych wspomnianych neuronów do warunków patologicznych (plastyczność neuronów), takich jak uszkodzenie mechaniczne komórki nerwowej i stan zapalny tkanek docelowych. Jednym z efektów tych badań naukowych było wykazanie diametralnie różnych mechanizmów reakcji przystosowawczych neuronów współczulnych zwoju IMG, czy też CSMG, zaopatrujących jelito biodrowe lub okrężnicę zstępującą pod wpływem działania takich czynników patologicznych jak aksotomia i/lub chemicznie wywołany stan zapalny (B 1.7, B 1.10, B.1.11, B.1.17, B.1.19, B 2.11, B 2.15, B.2.16, B.2.20, B 2.24, B 2.26). Uczestniczyłem także w badaniach dotyczących wpływu adenomatozy (rozrostowego stanu zapalnego jelit spowodowanego czynnikiem

bakteryjnym) lub chemiczne wywołanym stanem zapalnym na plastyczność populacji neuronów zwojów czuciowych DRG zaopatrujących jelito biodrowe oraz okrężnicę zstępującą. Podobnie jak, w przypadku neuronów współczulnych IMG, także neurony czuciowe uruchamiają całkowicie różne mechanizmy przystosowawcze uzależnione od rodzaju oddziaływujących na nie czynników patologicznych (B 1.12, B 1.13, B 2.25).

Kolejną, badaną przeze mnie populacją neuronów zaopatrujących jelito biodrowe i okrężnicę były śródściennie komórki nerwowe zlokalizowane w zwojach leżących w ścianie tych narządów. Efektem tych badań było wykazanie zmian ekspresji zawartych w nich neurotransmitterów wywołanych adenomatozą (B 1.14, B 1.15, B 2.28, B 2.30), dezynterią (B 2.27), bądź indukowanych aksotomią i/lub stanem zapalnym narządu docelowego (B 2.45). Dzięki współpracy z Katedrą Diagnostyki Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie brałem także udział w badaniach dotyczących porównania reakcji adaptacyjnych neuronów śródściennych zaopatrujących jelito czcze, indukowanych biegunką pochodzenia bakteryjnego bądź wirusowego (B.1.6).

D. Unerwienie struktur układu pokarmowego w przebiegu choroby nowotworowej u ludzi: (publikacje oryginalne nr: B 1.18, B 1.20 oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.31)

Powyższe publikacje dotyczyły zmian w unerwieniu okrężnicy i prostnicy człowieka w przebiegu raka. Uzyskane wyniki badań ujawniły neurochemiczną charakterystykę oraz analizę ilościową neuronów i struktur nerwowych leżących w ścianie wymienionych narządów.

E. Unerwienie dróg odprowadzających mocz: (publikacje oryginalne nr: B 1.8, B 1.9 oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.1, B 2.4, B 2.7, B 2.10, B 2.18, B 2.19, B 2.29)

Wymienione publikacje stanowiły kontynuacje badań nad obecnością i wzorami współwystępowania substancji biologicznie aktywnych w neuronach autonomicznych i czuciowych zaopatrujących **pęcherz moczowy** samicy świni oraz zdolności tych neuronów do reakcji plastycznych. W badaniach tych używałem techniki wstecznego transportu neuronalnego znacznika w celu wykrycia miejsc lokalizacji neuronów obwodowego układu nerwowego, które stanowią źródło pochodzenia włókien nerwowych z obszaru trójkąta pęcherza moczowego a także przeprowadzenia neurochemicznej charakterystyki wspomnianych komórek nerwowych, wykorzystując technikę pojedynczych i podwójnych barwień immunohistochemicznych. Zająłem się badaniem, zarówno populacji neuronów

autonomicznych zlokalizowanych na terenie zwojów IMG (B 2.1, B 2.4), zwojów przy- i przedkręgowych (B.2.10, B 2.29), zwojów miednicznych (B 2.18). Brałem także udział w badaniach określających lokalizację i kodowanie chemiczne autonomicznych neuronów śródściennych zaopatrujących trójkąt pęcherza (B.1.8).

5.2.1.2 Struktura i neurochemiczna organizacja zwojów nerwowych oraz wybranych ośrodków centralnego układu nerwowego

A. Badania nad lokalizacją receptora leptynowego w neuronach włączonych w gospodarkę tłuszczową organizmu świni: (*publikacje oryginalne nr: B 1.5 oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.3, B 2.6, B 2.9, B 2.12, B 2.14, B 2.17, B 2.21*)

Badania te dotyczyły udziału autonomicznych zwojów nerwowych oraz podwzgórzowej lokalizacji ośrodków nerwowych uczestniczących w unerwieniu tkanki tłuszczowej świni (B.1.5). Badania te prowadzono przy użyciu techniki wstecznego znakowania neuronów i metod immunohistochemicznych. Dotyczyły one nie tylko kodowania chemicznego neuronów zaopatrujących tkankę tłuszczową, ale także obecności receptorów leptynowych w tych komórkach nerwowych. Leptyna jest hormonem produkowanym przez komórki tłuszczowe. Uważa się, że zaburzenia w wydzielaniu tego hormonu mogą mieć związek z otyłością. Omawiane badania ujawniły, iż wiele neuronów zwojów przy- i przedkręgowych zaopatrujących tkankę tłuszczową świni zawiera receptory leptynowe. Sugeruje to, iż leptyna modyfikuje aktywność wspomnianych neuronów a zależność ta może być ważnym elementem mechanizmu regulującego metabolizm tkanki tłuszczowej. Należy zaznaczyć, że dostępna literatura nie zawierała danych na temat obecności receptorów leptynowych w neuronach obwodowego układu nerwowego, a światowe badania dotyczące leptyny podjęto na szeroką skalę stosunkowo niedawno.

B. Neurochemiczna organizacja zwojów nerwowych zaopatrujących pęcherz moczowy samca świni: (*publikacje oryginalne nr: B 1.23, B 1.24, B 1.25 oraz inne publikacje naukowe nr: B 2.34, B 2.36, B 2.40, B 2.41, B 2.42, B 2.43, B 2.44, B 2.46, B 2.49*)

Ostatnim etapem mojej pracy badawczej są badania dotyczące rozmieszczenia oraz neurochemicznej charakterystyki neuronów zlokalizowanych na terenie zwojów śródściennych - IG, zwojów czuciowych - DRG, zwojów przykręgowych - SChG,

przedkręgowych - IMG/CaMG oraz zwojów miednicznych - APG zaopatrujących anatomiczne struktury (trójkąt, szyjkę oraz wierzchołek) pęcherza moczowego samca świni. Końcowym efektem tej części badań naukowych są publikacje wchodzące w skład mojej rozprawy habilitacyjnej.

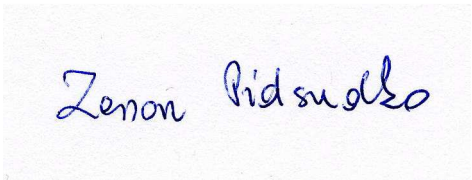
5.2.1.3 Varia : (publikacje oryginalne nr: **B 1.16, B 1.22** oraz inne publikacje naukowe nr: **B 2.32, B 2.37, B 2.38, B 2.39**)

Do tej części mojej pracy naukowej zaliczam prace badawcze, których tematyka nie daje się przyporządkować powyższemu podziałowi. Są to między innymi publikacje prezentujące wyniki badań dotyczących rozmieszczenia źródeł zaopatrzenia nerwowego i neurochemicznej charakterystyki neuronów czuciowych zaopatrujących mięsień czworoboczny świni (B 2.47), immunohistochemicznej charakterystyki włókien nerwowych zaopatrujących śliniankę przyuszną oraz podjęzykową u bobra europejskiego (B 2.48) oraz plastyczność komórek nowotworowych raka Merkla w ognisku pierwotnym i przerzutowym (B 1.22).

Szczególłą grupę badań stanowiły badania dotyczące wpływu zmiennego, pulsacyjnego pola magnetycznego na funkcje ręki i chód w przebiegu stwardnienia rozsianego. W stwardnieniu rozsianym (SR) dochodzi do uszkodzeń w wielu, różnych częściach układu nerwowego dając wieloogniskowe objawy neurologiczne, które w kolejnych rzutach choroby tworzą różne postaci choroby. Dominującym objawem jest niewydolność ruchowa, która postępuje, prowadząc w różnym czasie do trwałego inwalidztwa. W chorobie tej bardzo często dochodzi do uszkodzenia drogi wzrokowej. Celem pracy była ocena wpływu magnetostymulacji gałek ocznych na pole widzenia, funkcję ręki oraz chód chorych ze stwardnieniem rozsianym. Zastosowano urządzenie „Unittron” jako magnetostymulator. Urządzenie Unittron składające się z generatora pól magnetycznych o niskich wartościach indukcji i aplikatura w postaci maty oraz dodatkowego aplikatura na gałki oczne. Aplikatory wytwarzają niejednorodne pole magnetyczne o częstotliwościach 180-195 Hz i kształcie piłokształtnym. Takie ukształtowanie impulsów ułatwia wystąpienia efektów biofizycznych: jonowego rezonansu cyklotronowego, magnetomechanicznego i elektrodynamicznego. Maksymalna wartość indukcji na powierzchni maty nie przekracza 45 μ T. Wyniki tych badań wykazały, iż w większości przypadków, po stymulacji magnetycznej obserwowaliśmy poprawę wszystkich badanych parametrów układu wzrokowego i narządu ruchu. Wyniki porównano z grupą kontrolną, u której nie zastosowano stymulacji magnetycznej.

W chwili obecnej kontynuuję prace badawcze dotyczące wzorów unerwienia i kodowania chemicznego neuronów leżących na terenie centralnego układu nerwowego zaopatrujących struktury pęcherza moczowego świni.

Wykaz wszystkich moich publikacji naukowych będących wynikiem realizacji powyższych tematów badawczych wraz z pełnym wykazem opublikowanych przeze mnie prac naukowych, dokładnymi informacjami o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy krajowej i zagranicznej oraz o działalności popularyzującej naukę znajdują się w załącznikach nr 3 i nr 4 dołączonych do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.



Zenon Pidsudko