

Rada Dyscypliny Weterynaria
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Amelia Franke-Radowiecka

.....
(imię i nazwisko wnioskodawcy)

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

.....
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Wniosek

z dnia**23.08.2021**.....

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie **nauki rolnicze** w dyscyplinie¹ **weterynaria**

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy pod wspólnym tytułem:

„Morfologia i cechy neurochemiczne struktur obwodowego autonomicznego i czuciowego układu nerwowego związanych z unerwieniem serca i żeńskich narządów rozrodczych u świni w okresie prenatalnym.”

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym***²

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.

Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Agnieszka Frenclik-Rodowiczka

.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

1. Wniosek przewodni
2. Dane wnioskodawcy
3. Uwierzytelniona kopia odpisu dyplomu doktora nauk weterynaryjnych
4. Autoreferat
5. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
6. Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego oraz oświadczenia współautorów
7. Potwierdzenie odbycia staży oraz otrzymania nagród

Autoreferat

dr n. wet.

Amelia Franke-Radowiecka

Katedra Anatomii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2021

1. Imię i nazwisko

Amelia Franke-Radowiecka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Tytuł: lekarza weterynarii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo - Techniczna w Olsztynie, rok uzyskania 1997

Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie anatomii zwierząt Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie, rok uzyskania 2003, tytuł rozprawy: „*Immunochemiczny charakter neuronów zaopatrujących gruczoł mlekowy świni*”, Promotor: Prof. dr hab. Mirosław Łakomy

Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą

JM Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 01.04.1997 - 31.08.1999 – asystent, Katedra Anatomii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie
- 01.09.1999 - 30.11.2004 – asystent, Katedra Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 01.12.2004 – do dnia dzisiejszego – adiunkt, Katedra Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Morfologia i cechy neurochemiczne struktur obwodowego autonomicznego i czuciowego układu nerwowego związanych z unerwieniem serca i żeńskich narządów rozrodczych u świni w okresie prenatalnym.”

Cykl ten obejmuje 3 publikacje w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny współczynnik oddziaływania impact factor (IF) wynosi **5,899** według daty publikacji a łączna liczba punktów MNiSW według wykazu z 18 grudnia 2019 wynosi **280** punktów.

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu

4.2.1. **Franke-Radowiecka A.**, Prozorowska E., Zalecki M., Jackowiak H., Kaleczyc J. (2019) *Innervation of internal female genital organs in the pig during prenatal development*. Journal of Anatomy 235(5):1007-1017. doi: 10.1111/joa.13052.

IF 2,013; punktacja MNiSW: 140

Praca została wyróżniona nagrodą JM Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za najlepszy artykuł naukowy lub dzieło artystyczne opublikowane w 2019r.

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu większości barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej i interpretacji wyników opracowaniu dokumentacji zdjęciowej oraz opracowaniu manuskryptu.

4.2.2 **Franke-Radowiecka A.** (2020) Paracervical ganglion in the female pig during prenatal development: morphology and immunohistochemical characteristics. Histology and Histopathology 35(11):1363-1377. doi: 10.14670/HH-18-287

IF 2.303; punktacja MNiSW: 70

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej i interpretacji wyników, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej oraz opracowaniu manuskryptu.

4.2.3. **Franke-Radowiecka A.**, Zmijewska N., Zubkiewicz T., Zalecki M., Klimczuk M., Listowska Ż., Kaleczyc J. (2020) Nerve structures of the heart and their immunohistochemical characterization in 10-week-old porcine fetuses. Comptes Rendus Biologies 343(1):53-62. doi: 10.5802/crbiol.4.

IF 1,583; punktacja MNiSW: 70

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu większości barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej i interpretacji wyników oraz opracowaniu manuskryptu.

4.3. Omówienie prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe

4.3.1. Wprowadzenie, cel i zadania badawcze

Autonomiczny i czuciowy układ nerwowy rozwija się z komórek grzebieni nerwowych (neural crest cells; NCC), które powstają w okresie różnicowania się neuroektodermy. U człowieka przypada to na siedemnasty do dwudziestego pierwszego dnia, u świni natomiast na około trzynasty do piętnastego dnia rozwoju embrionalnego (89). W miejscu gdzie brzezi rynienki nerwowej łączą się w cewę nerwową, na całej długości i po obu jej stronach powstają grzebienie nerwowe (34, 62, 63, 89), składające się z multipotencjalnych komórek, charakteryzujących się dużą plastycznością, możliwością migracji i przekształcania się w wiele struktur obwodowych w ciele zarodka. Po raz pierwszy populację tych niezwykłych komórek w embrionie kurczęcia opisał niemiecki embriolog, anatom i histolog Wilhelm His w 1868 roku (40, 107). Niezależnie uczynił to angielski zoolog, Artur Milnes Marshall (1852-1893), który nadał nazwę strukturom, z których wywodzą się te niezwykle komórki – „grzebienie nerwowe” (77). Analiza zakresu istniejącej wiedzy, dotyczącej rozwoju obwodowych autonomicznych i czuciowych struktur nerwowych w okresie prenatalnym, nawiązuje przede wszystkim do kształtowania się grzebieni nerwowych i losów NCC. Dalsze etapy rozwoju struktur nerwowych i procesy im towarzyszące, takie jak neurogeneza, gangliogeneza, apoptoza, wnikanie aksonów do narządów czy wzory kodowania chemicznego neuronów, są słabo poznane.

Najnowsze badania wykazały, że u kręgowców wyższych proces indukcji grzebieni nerwowych rozpoczyna się już w stadium gastruli a NCC są identyfikowane (84, 106) i posiadają zdolność migracji jeszcze przed zamknięciem cewy nerwowej (84). Miejsce pochodzenia NCC z cewy nerwowej, ekspresja wielu genów, uwalnianie substancji sygnałowych oraz wskazówki środowiskowe determinują los poszczególnych komórek grzebieni (7). Generalnie z NCC powstają obwodowe struktury autonomicznego układu nerwowego, zwoje rdzeniowe i zwoje czuciowe nerwów czaszkowych, lemoplasty w nerwach obwodowych, a także elementy nienerwowe, np. melanocyty, komórki ektomezenchymy, z których wykształcają się między innymi opony mózgowie, skóra głowy, elementy kostne, chrząstkowe i mięśniowe niektórych łuków skrzelowych, jak również brodawki zębowe i odontoplasty (1, 7, 11, 107). NCC mają zdolność samoodnowy, co było cechą przypisywaną jedynie komórkom macierzystym (112), wiadomo również, że multipotencjalne NCC

zidentyfikowano nie tylko we wczesnym stadium embrionalnym, ale także w wieku dorosłym. Ten fakt wzbudza ogromną fascynację naukowców i nadzieję na opracowanie nowych metod regeneracji struktur nerwowych i narządów (122, 128). Komórki te obserwowano między innymi w zwojach rdzeniowych (73), szpiku kostnym (81), sercu (116), skórze (81), rogówce (10) czy miazdze zębowej (107) u dorosłych gryzoni i ludzi.

Komórki grzebieni nerwowych, migrujących z przedniej części zarodka na wysokości trzech pierwotnych pęcherzyków mózgowych (przodomózgowia, śródmózgowia i tyłomózgowia), biorą udział w tworzeniu głowowych zwojów nerwowych, przedniej części oka (27, 107), większości tkanki łącznej oraz szkieletu twarzoczaszki. Przeprowadzone badania *in vivo* na zarodkach kurzych wykazały (21), że komórki grzebienia nerwowego głowy wykazują największą multipotencjalność, ponieważ wykazują zdolność do wytwarzania klonów zawierających typy komórek tak różnych jak neurony, gliej, melanocyty, chondrocyty, osteoblasty oraz mięśnie gładkie (12, 21, 107).

W oparciu o budowę kurzego zarodka (117) sercowe NCC znajdują się między rombomerem piątym a somitem trzecim i migrując wypełniają łuki gardłowe – trzeci, czwarty i szósty, a następnie uczestniczą w tworzeniu się komórek mięśni gładkich układu sercowo-naczyniowego i przegrody aortalno-płucnej (8, 59, 60, 66). Po okresie różnicowania *in vitro* komórki te dają początek neuronom, komórkom glejowym i mięśniom gładkim (7). U zarodka kurzego, na wysokości od pierwszego do siódmego somitu, z grzebienia nerwowego migrują komórki tzw. błędnego NCC (vagal NCC). Błędne NCC u Danio przegowanego całkowicie pokrywa się z obszarem sercowych NCC (34, 122), natomiast u gryzoni sercowe NCC (somit 1-3) pokrywają się tylko z przednią częścią regionu błędnego NCC (117). U kurzego zarodka błędne NCC wraz z krzyżowymi NCC (od 28 somitu) przyczyniają się do utworzenia jelitowego układu nerwowego. Grzbietowe NCC położone są na wysokości od 8 do 28 somitu.

U ptaków i ssaków NCC przemieszczają się na obwód dwiema drogami, brzuszno-przyśrodkową biegnącą przez przedni sklerotom i grzbietowo-boczną pomiędzy ektodermą powierzchniową a somitami (1, 62, 63, 71). NCC przemieszczające się brzusznie-przyśrodkowo biorą udział w tworzeniu czuciowych i współczulnych zwojów nerwowych, a także lemblastów i komórek chromafinowych (1, 62, 63). Natomiast NCC podążające grzbietowo-boczną generują melanocyty (21, 62, 71). Krzyżowe NCC są najslabiej poznaną grupą komórek. Badania przeprowadzone na ptakach i gryzoniach (128, 133) wykazały, że

biorą one udział w tworzeniu splotu miednicznego i kształtowaniu się zatoki moczowopłciowej (128, 129).

Proces tworzenia się NCC w poszczególnych odcinkach cewy nerwowej, uwalnianie się komórek z grzebieni nerwowych, migracja w kierunku celu, proliferacja czy różnicowanie odbywa się przy udziale rozbudowanej sieci regulacyjnej, która obejmuje ekspresję wielu genów, uwalnianie cząsteczek sygnałowych, a także niezliczone, złożone wskazówki środowiskowe (11, 28, 30, 90, 95, 104, 113, 132). Część tych procesów oraz czynników leżących u ich podstaw została dosyć dobrze poznana. Brak którejkolwiek składowej zaburza prawidłowy rozwój NCC, jak również struktur tworzonych przez poszczególne komórki grzebieni nerwowych. Neurokrystopatie to choroby wielonarządowe, wynikające z zaburzeń rozwojowych i oparte na defekcie NCC. Obejmują one z reguły struktury nerwowe i narządy, które przez te struktury są unerwiane. Dobrze rozpoznany przykładem jest mutacja genu Pax3 i Pax7 u myszy (14), która jest przyczyną deformacji szczęki i nosa oraz niedorozwoju obwodowego układu nerwowego w tym obszarze. Nieprawidłowości czaszkowo-twarzowe wraz z ubytkami zwojów i nerwów czaszkowych były obserwowane u myszy z mutacją genu AP-2 (135). W przypadku mutacji genu Sox10 myszy posiadały zdeformowane zwoje nerwowe i ubytki w unerwieniu jelit (7), natomiast mutacja w Pax3 lub Msx1/2 skutkowałą wadami serca (7, 14). U ludzi występuje wiele dobrze poznanych i diagnozowanych zespołów wad wrodzonych związanych z NCC, na przykład Zespół Mowata-Wilsons (11), charakteryzujący się występowaniem dysmorfii twarzoczaszki jednocześnie ze zróżnicowanymi wadami wrodzonymi serca, nerek, chorobą Hirschsprunga, anomaliami rozwojowymi ośrodkowego układu nerwowego oraz narządów rozrodczych. Zespół Leopard (103), Zespół Noonan (111) czy Zespół Charge (91), gdzie oprócz wad związanych z upośledzeniem przewodnictwa w sercu i okolicy trzewno-czaszkowej występuje również wnetrostwo, aplazja i hipoplazja jajników lub niedorozwój różnych odcinków układu rozrodczego.

Ważnym etapem w rozwoju obwodowych struktur nerwowych jest tworzenie się zwojów, jak również proliferacja, dojrzewanie, apoptoza komórek nerwowych, wzrost i osiągnięcie celu przez aksony, ale także procesy związane ze zmianą fenotypu komórki nerwowej po dotarciu jej aksonu do celu. Ten proces w rozwoju układu nerwowego został zbadany w umiarkowanym stopniu. Dotychczas dość dobrze poznano procesy tworzenia się zwojów pnia współczulnego (1, 133), rdzeniowych (1, 33, 73), serca (38), zwojów jelitowych (133) i zwoju rzęskowego u piskląt (37). Wydaje się, że np. ligandy efryny B działają

w pierwszej kolejności jako „odpychające” wskazówki prowadzące do odparcia pierwszych migrujących NCC ze szlaku grzbietowo-bocznego na szlak brzuszno-przyśrodkowy, a dopiero później stymulują migrację prekursorów melanocytów drogą grzbietowo-boczną (101). NCC migrujące brzusznie-przyśrodkowo wzdłuż przedniej połowy każdego somitu (62, 65, 128, 133) przeznaczone są do formowania zwojów rdzeniowych lub współczulnych. Wnt działający poprzez wewnątrzkomórkową cząsteczkę β -kateiny (aktywacja sygnału Wnt/b-kateiny) promuje linię czuciową kosztem wszystkich innych losów komórek grzebienia nerwowego i jest wymagany do neurogenezy czuciowej (33, 72, 73). Zwoje rdzeniowe w przedniej części ciała pojawiają się wcześniej (E11,5) niż te w tylnej (E12,5), co ujawniły badania na płodach myszy (72, 73, 117). Migracja prekursorów neuronów współczulnych do aorty grzbietowej odbywa się przy udziale czynników sygnalizacyjnych, takich jak Eph/efryny czy Neurofiliny/Semaforyny. W tym miejscu NCC tracą swoją organizację segmentową, mieszają się i ponownie łączą, tworząc zwoje pnia współczulnego (2, 132, 133). Bierze w tym udział między innymi N-kadheryna, która sprzyja adhezji komórek (52, 53, 133). Przypuszcza się również, że semaforyna 3A (Sem3A) działająca przez receptory Nrpl przyczynia się do agregacji prekursorów układu współczulnego w odpowiednim miejscu. Jako cząsteczka hamująca Sem3A ulega ekspresji w tylnym sklerotomie oraz całym dermatomitomie i działa jako odpychająca wskazówka dla NCC tułowia (110, 133). Wiadomo jest również, że białko morfogenetyczne kości (BMP-4) wydzielane przez aortę grzbietową indukuje różnicowanie NCC do neuronów współczulnych (63, 65, 105). Wiele sygnałów zewnętrznych i wewnętrznych wpływa na tworzenie się zwojów współczulnych, a także na ich dalszy rozwój. Zakłócenia tych procesów mogą skutkować ubytkami zwojów lub ich całkowitym brakiem, a w konsekwencji nieprawidłowym unerwieniem narządów, które zaopatrują. W trakcie rozwoju neuronów współczulnych zauważono zjawisko programowanej śmierci komórkowej (apoptozy), które u płodów myszy zaczyna się w E15,5 i jest kontynuowane po urodzeniu. (70, 133). Przeżycie neuronów współczulnych na wczesnym etapie zależne jest od czynników troficznych, natomiast później apoptoza jest konsekwencją konkurencji sygnałów troficznych wydzielanych z tkanki docelowej (133). Z wcześniejszych badań na gryzoniach i pisklętach wynika, że NGF ulega ekspresji w docelowej tkance neuronów współczulnych, a ekspresja receptora TrkA wpływa na rozwój neuronów współczulnych. Przeżycie neuronów współczulnych, gdzie pośredniczy NGF-TrkA, zależy od wielu pętli sprzężenia zwrotnego, w których NGF reguluje ekspresję TrkA i innych neurotrofin (23, 63, 133). Mechanizmy

i czynniki odpowiedzialne za wzrost aksonów współczulnych w kierunku celu są dosyć dobrze poznane. Artemina (134), neurotrofina-3 (69) lub endotelina-3 (76) są czynnikami związanymi z naczyniami krwionośnymi indukującymi wzrost aksonów. Inna grupa czynników, takich jak NGF lub Bax, może być wówczas odpowiedzialna za wejście współczulnych aksonów do określonej tkanki docelowej (63, 133). Brak jakiegokolwiek czynnika zakłóca migrację, proliferację i projekcję aksonów do ich celów. Na przykład inaktywacja genów kodujących arteminę prowadzi do częściowego przerwania projekcji aksonów wzdłuż naczyń krwionośnych (41), brak neurotrofiny-3 powoduje częściowe przerwanie projekcji aksonów współczulnych do celu (63, 70, 133).

Jeżeli przyjrzymy się istniejącym danym na temat przywspółczulnej części autonomicznego układu nerwowego, to wiedza dotycząca kształtowania zwojów jest zdecydowanie mniejsza. Wiadomo, że większość neuronów oraz komórek glejowych zwojów przywspółczulnych pochodzi z głowowej, sercowej, błędnej oraz z sakralnej części NCC (71, 132, 133).

Mało jest danych na temat proliferacji, śmierci oraz różnicowaniu się komórek przywspółczulnych (37, 133). Na podstawie badań rozwoju zwoju rzęskowego (132, 133) oraz w okrojonym wymiarze innych zwojów głowowych (klinowo-podniebiennego, żuchwowego, usznego) (37) wiadomo, że do tworzenia się tych zwojów i z dużym prawdopodobieństwem innych zwojów przywspółczulnych, np. jelitowych, niezbędnymi i docelowymi czynnikami neurotroficznymi są substancje należące do rodziny ligandów GDNF. Należą do nich czynniki pochodzące z linii komórek glejowych (GDNF) i neurturyna, mające kluczowe znaczenie dla rozwoju tych zwojów (37). Obecność GDNF niezbędna jest we wczesnych etapach rozwoju przywspółczulnych zwojów głowowych, ponieważ czynnik ten wpływa na proliferację, migrację neuronalnych prekursorów i formowanie się zwojów. Wydaje się również, że działa jako chemoatraktant dla aksonów neuronów zwojowych wrastających do tkanki docelowej (37, 133). Neurturyna, pozostająca na stałym poziomie podczas całego okresu rozwoju, jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania neuroblastów postmitotycznych („młodych neuronów”), jak również wpływa na prawidłowy wzrost aksonów w kierunku celu (22, 37). Brak neurturyny prowadzi do zmniejszonej liczby neuronów przywspółczulnych (70, 133), a myszy, posiadające zerowy zmutowany allel dla neurturyny (61) lub jej receptora o wysokim powinowactwie (GFR α 2), wykazywały znaczne zmniejszenie przywspółczulnego unerwienia w gruczołach łzowych i ślinowych (37).

Wykazano, że NCC serca migrują wzdłuż tętnic na wysokości szóstego łuku gardłowego (38, 133), z nich tworzą się gałęzie sercowe nerwu błędnego, które obserwowano po raz

pierwszy w zarodku kurczaka w HH24 grzbietowo w mezokardium, kierujące się do zatoki żylniej. Pomiędzy HH28-29 obserwowano dalsze gałęzie tworzącego się nerwu błędnego, rozciągające się w kierunku bieguna żylnego i tętniczego zawiązka serca, biegnące wzdłuż tętnic przechodzących przez trzeci i czwarty łuk gardłowy oraz lewej i prawej żyły zasadniczej (38). Dowiedziono, że po ablacji grzebienia nerwowego serca, formowanie nerwu błędnego jest zaburzone, zwoje sercowe są mniejsze i zawierają zdecydowanie mniej neuronów, a aktywność układu przywspółczulnego jest wyraźnie zmniejszona (38, 60). U zarodka myszy po raz pierwszy migrujące NCC serca obserwowano w E10.5 (w przybliżeniu HH20 u pisklęcia), a pierwsze elementy nerwowe w sercu, między oddzielającymi się drogami odpływu, widoczne były w E11,5 (38). W E12.5 i późniejszych etapach rozwoju u myszy barwienia immunohistochemiczne w kierunku VAcHT i TH wykazały, że formujące się sploty nerwowe zawierały wiele neuronów przywspółczulnych i w małej liczbie neurony współczulne (15). Ze splotu sercowego większość neuronów autonomicznych przemieszcza się między aortą a pniem płucnym, rozciągając się wzdłuż tętnic wieńcowych, zanim ulegną rozgałęzieniu w celu unerwienia przedsionków i komór (38, 54). Komórki z tylnego obszaru grzebienia nerwowego czaszki, NCC serca i nerwu błędnego przyczyniają się do tworzenia nerwów przywspółczulnych i zwojów serca, a także niektórych nerwów czuciowych. Komórki prekursorowe z odcinka grzbietowego grzebienia nerwowego tworzą nerwy współczulne, zaopatrujące serce. Przynajmniej kilka genów i szlaków sygnałowych zawiaduje losami NCC serca (38). Migracja i proliferacja sercowych NCC regulowana jest również przez wtórne pole sercotwórcze (SHF) poprzez szlak sygnałowy NOTCH. SHF mieści się w mezodermie trzewnej, po brzusznej stronie gardła i z jego komórek powstaje część prawej komory, część przedsionków i również drogi odpływu (stożek tętniczy, pień tętniczy) (38). Tak jak uszkodzenia sercowych NCC, także uszkodzenia SHF mogą skutkować wadami drogi odpływu. Podobnie jak w przypadku przywspółczulnych zwojów głowowych GDNF i neurturyna są również zaangażowane w rozwój zwojów sercowych, przeżycie neuronów i prawdopodobnie projekcję aksonów neuronów zwojowych do tkanek serca (39).

Wiedza dotycząca kształtowania się szeregu innych zwojów nerwowych jest bardzo fragmentaryczna lub jej brak, opiera się jedynie na szlakach migracyjnych przy nieznanym, pojedynczym bądź jedynie domyślnym czynnikach transkrypcyjnych.

Ostateczny fenotyp neuronów (adrenergiczny lub cholinergiczny) zależy od sygnałów pochodzących z tkanki docelowej (2, 63, 74, 133), a te sygnały wsteczne obejmują szereg

czynników wzrostu i cytokin (133). Jednym z najbardziej znanych przykładów wpływu tkanki docelowej na neurochemiczne kodowanie neuronów są komórki nerwowe zaopatrujące gruczoły potowe lub okostną u nowonarodzonych gryzoni, u których stwierdzono, że neurony adrenergiczne zwiększają aktywność enzymów syntetyzujących acetylocholinę oraz jej transporterów i w konsekwencji stają się neuronami cholinergicznymi (26). Innym przykładem jest zwój rzęskowy kurczęcia, w którym sieć czynników transkrypcyjnych (*Ascl1*, *Phox2a*, *Phox2b*) początkowo kontroluje różnicowanie neuronów w sposób podobny do czynników kontrolujących różnicowanie neuronów współczulnych, chociaż dojrzałe neurony zwoju rzęskowego mają charakter cholinergiczny (42, 133). Istnieje także model alternatywny powyższych rozważań, według którego oba fenotypy (adrenergiczny i cholinergiczny) są prawie jednocześnie indukowane przez BMP i przejściowo współwyrażane na wczesnym etapie rozwoju. Oba zestawy genów markerowych neuroprzebieżników ulegają ekspresji przed unerwieniem celu i poprzez proces selekcji celu, w rezultacie konkretny fenotyp jest wzmacniany i stabilizowany jako specyficzny dla celu wybór neuroprzebieżnika (3).

Powyższy przegląd literatury ukazał najlepiej poznane aspekty rozwoju układu nerwowego. Pozostaje jednak wiele niewyjaśnionych kwestii, które mogą mieć istotny wpływ na rozwój unerwienia narządów i samych narządów. Przykładem tego może być fakt przejściowego pojawiania się neuronów w ścianie pęcherza moczowego szczura podczas rozwoju i wczesnej fazy postnatalnej, a następnie prawie ich całkowity zanik w wieku dorosłym (136). Wiadomo również, że neurony zwojów splotu miednicznego co najmniej podwajają swoją liczbę w okresie poporodowym (56), a w dwóch pierwszych tygodniach po urodzeniu u tego gatunku około 30-40% neuronów zwoju szyjnego górnego ulega apoptozie (130). U człowieka dojrzewanie komórek zwojów jelitowych i osiągnięcie ich pełnej sprawności funkcjonalnej może trwać do kilku lat po urodzeniu (5, 63). W rozwoju prenatalnym kontrola akcji serca zapoczątkowana zostaje przez układ przywspółczulny, później jednak dochodzi do dominacji układu współczulnego (35, 63). Z przytoczonych danych można wywnioskować, że rozwój narządów następuje równolegle z rozwojem ich unerwienia (57), ale rozumienie korelacji czasu i mechanizmów wpływających na powstanie tego unerwienia, jak również aspektów jego plastyczności w rozwoju prenatalnym jest bardzo ograniczone. Najmniej wiadomo na temat dystrybucji i wzorów kodowania chemicznego włókien nerwowych na terenie rozwijających się narządów w różnych okresach rozwoju. Dostępne informacje dotyczą peptydergicznego unerwienia serca (31, 109), jelit (99,

118), mięśnia dźwigacza odbytu (82), gruczołu krokowego (45), pęcherza moczowego (57), jak również dróg moczowych (4, 82). Badania były prowadzone głównie na płodach gryzoni i w mniejszym stopniu człowieka. Należy jednak pamiętać, że nie wszystkie poznane fakty można jednoznacznie potraktować jako ogólny schemat i przełożyć na każdy gatunek. Zostało to zauważone przy analizie wyników otrzymanych na bazie rozwoju Danio pręgowanego (1, 96, 133), zarodków i płodów gryzoni, kurcząt i w znikomym stopniu człowieka (3, 22, 133). Istnieje zatem ogromna luka w obszarze dotyczącym rozwoju unerwienia narządów w okresie prenatalnym, a szczególnie jego fazie płodowej. Intensywny rozwój nowych gałęzi medycyny (medycyna regeneracyjna, ksenotransplantologia), opierających się w dużej mierze na wiedzy z zakresu neuroanatomii, jednoznacznie potwierdza potrzebę przeprowadzania takich badań. Operacje przeszczepów serca czy usuwania narządów jamy miedniczej, np. w przebiegu procesów nowotworowych, mogą wiązać się z nieodwracalnymi uszkodzeniami struktur nerwowych, zaopatrujących przyległe tkanki i narządy, co w konsekwencji przekłada się na zaburzony komfort życia pacjenta. Budzi to potrzebę badań nad możliwościami regeneracyjnymi tkanek. Każdy ustalony nowy fakt, związany z unerwieniem narządów od najwcześniejszych etapów rozwoju, może mieć istotne znaczenie i przełożenie kliniczne. Co więcej, rozpatrywanie świń transgenicznych jako potencjalnych dawców narządów dla ludzi (127) skłania do prowadzenia badań na tym gatunku, który również ze względu na anatomiczne, fizjologiczne i biochemiczne uwarunkowania jako model eksperymentalny w badaniach biomedycznych jest bliższy człowiekowi niż gryzoni (115, 121).

W związku z powyższym, głównym celem przedłożonego do oceny cyklu publikacji naukowych było (1) zbadanie zmian zachodzących w rozwoju prenatalnym samicy świni domowej (*Sus domestica*) dotyczących unerwienia wybranych narządów, (2) ujawnienie zmian obejmujących chemiczne kodowanie włókien nerwowych zaopatrujących te narządy, jak również (3) zmian dotyczących morfologii i chemicznego kodowania neuronów zwojów nerwowych, stanowiących możliwe źródła ich zaopatrzenia.

Brak takich danych u świni zdecydował o przeprowadzeniu badań, w których wyróżniono następujące tematy badawcze:

1. Zbadanie rozwoju unerwienia żeńskich narządów rozrodczych przy jednoczesnej morfologicznej analizie tych narządów u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów świni oraz zaobserwowanie różnic w rozmieszczeniu struktur nerwowych pomiędzy poszczególnymi okresami życia płodowego.

2. Określenie chemicznego kodowania struktur nerwowych zaopatrujących rozwijające się żeńskie narządy rozrodcze u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów świnii pod kątem głównych neurotransmiterów dla struktur adrenergicznych (D β H), cholinergicznyc (VAcHt) i czuciowych (CGRP, SP).
3. Zbadanie rozwoju zwoju przyszyjkowego u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów samicy świnii w aspekcie morfologicznym.
4. Określenie chemicznego kodowania neuronów rozwijającego się zwoju przyszyjkowego u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów samicy świnii pod kątem głównych neurotransmiterów dla struktur adrenergicznych (D β H), cholinergicznyc (VAcHt) i czuciowych (CGRP, SP).
5. Określenie profilu immunohistochemicznego neuronów rozwijającego się zwoju przyszyjkowego u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów samicy świnii pod kątem wybranych neuropeptydów (NPY, SOM, VIP, GAL, NOS), które są charakterystyczne dla tego zwoju.
6. Zbadanie rozmieszczenia komórek oraz włókien nerwowych na terenie serca u 10-tygodniowych płodów świnii z uwzględnieniem morfologicznyc aspektów zwoju zatokowo-przedsionkowego i przedsionkowo-komorowego.
7. Określenie chemicznego kodowania komórek i włókien nerwowych pod kątem głównych neurotransmiterów dla struktur adrenergicznych (D β H), cholinergicznyc (VAcHt) i czuciowych (CGRP, SP) w sercu 10-tygodniowych płodów świnii.

4.3.2 Materiały i metody

Materiał do badań pozyskano z okolicznyc rzeźni. Zgodnie z polskim prawem i dyrektywą UE (nr 2010/63/UE) eksperymenty wykonane w niniejszyc opracowaniach nie wymagają zgody Komisji Etycznej. Do badań wykorzystano tylko płody żeńskie. Zwierzęta podzielono na trzy grupy wiekowe: F1 - 5 tygodni (3-4 cm długości), F2 - 7 tygodni (7-8 cm długości), i F3 - 10 tygodni (13-14 cm długości). W przypadku 5-tygodniowych płodów

zastosowano identyfikację płci przy użyciu techniki PCR. Wiek płodów oznaczano metodą ciemieniowo-siedzeniową (crown-rump length, CRL). Płody mierzono wzdłuż kręgosłupa, od części ciemieniowej głowy do nasady ogona (24). Po wyjęciu płodów z macicy, rozcinano ich klatkę piersiową i skórę brzucha w celu lepszej penetracji roztworu utrwalającego. Płody utrwalano przez zanurzenie w 4% buforowanym paraformaldehydzie (pH 7,4; F1-1h, F2-2h; F3-4h), przepłukiwano buforem fosforanowym (pH 7,4; 24h) i przenoszono do 18% buforowanego roztworu sacharozy (pH 7,4), w którym były przechowywane do dalszej badań. W zależności od podjętego tematu badawczego odpowiednie tkanki wypreparowywano, krojono przy użyciu kriostatu na skrawki o grubości 12 μm , na których przeprowadzono pojedyncze i podwójne barwienia immunohistochemiczne. Skrawki barwiono przy użyciu przeciwciał przeciwko pan-neuronalnemu markerowi struktur nerwowych PGP-9.5, β -hydroksylazie dopaminy (D β H), transporterowi pęcherzykowemu acetylocholinyl (VAChT), peptydowi kodowanemu genem kalcytoniny (CGRP) i substancji P (SP), a w przypadku tematu badawczego nr 5 zastosowano również przeciwciała przeciwko neuropeptydowi Y (NPY), somatostatynie (SOM), naczynioaktywnemu peptydowi jelitowemu (VIP), galaninie (GAL) i syntazie tlenu azotu (NOS). Dodatkowo przeprowadzono barwienia kontrolne (metodę omięcia, zamiany lub preabsorpcji; z j. ang. omission, replacement, preabsorption) w celu zbadania specyficzności znakowania immunohistochemicznego. Nie zaobserwowano fluorescencji w żadnym z barwień kontrolnych, co potwierdziło specyficzność barwień. Wyznakowane skrawki oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym Zeiss Axiophot wyposażonym w epifluorescencję i odpowiedni zestaw filtrów dla AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Preparaty układu moczowo-płciowego były również badane i dokumentowane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego SEM LEO 435 VP (ZEISS) przy napięciu przyspieszającym 10–15 kV (temat badawczy nr 1, 2). Ogólną liczbę perykarionów w zwojach liczono w różnej odległości skrawków w zależności od badanego zwoju lub organu. Uzależnione to było od wielkości neuronów. Preparaty pochodzące ze zwoju przyszyjkowego analizowano odpowiednio: u siedmiotygodniowego płodu – w każdym skrawku (największa średnica perykarionu 11 μm), u dziesięcioletniowego płodu – w co drugim skrawku (największa średnica perykarionu 17 μm). W przypadku serca, ciała komórek nerwowych liczono w co trzecim skrawku (największa średnica perykarionu 20 μm). Aby określić odsetek poszczególnych populacji neuronów, brano pod uwagę nie mniej niż 100 profili neuronalnych dla każdej kombinacji surowic. Liczba immunoreaktywnych profili komórkowych została

obliczona jako odsetek immunoreaktywnych neuronów w odniesieniu do wszystkich policzonych PGP-pozytywnych komórek nerwowych. Analizę statystyczną (zadanie badawcze nr 5) przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1. Użyto testu wariancji jedno- i dwuskładnikowej, testu Fishera, testu Studenta i Bonferroniego. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie \pm SEM. Dokładne informacje dotyczące tych zagadnień zostały zawarte w poszczególnych pracach stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.

4.3.3 Omówienie wyników i dyskusja

Unerwienie narządów rozrodczych żeńskich świń podczas rozwoju prenatalnego.

Realizacja zadania 1. i 2. miała na celu zbadanie rozwoju unerwienia żeńskich narządów rozrodczych u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów świni oraz zaobserwowanie różnic w rozmieszczeniu struktur nerwowych pomiędzy poszczególnymi okresami życia płodowego, jak również określenie immunohistochemicznej charakterystyki struktur nerwowych zaopatrujących rozwijające się żeńskie narządy rozrodcze pod kątem głównych neurotransmiterów dla struktur adrenergicznych (D β H), cholinergicznym (VAcHT) i czuciowym (CGRP, SP). Do badań użyto 19 płodów 5-tygodniowych, 13 płodów 7-tygodniowych i 14 płodów 10-tygodniowych. Badania dotyczące rozwoju unerwienia zostało uzupełnione analizą morfologiczną struktur związanych z rozwojem układu moczowo-płciowego przy użyciu mikroskopii skaningowej i konfokalnej. (Artykuł 4.2.1)

W okresie zarodkowym punktem wyjścia dla rozwoju żeńskich narządów płciowych u ssaków są śródnercza (29, 32, 36, 89, 108, 114). Nabłonek mezotelialny, wyściełający brzuszno-przyśrodkową powierzchnię śródnerczy, ulega pogrubieniu i wraz z leżącą pod nim mezenchymą tworzy grzebienie płciowe, które są zawiązkami jajników, u samców - zawiązkami jąder (32, 36, 89). U świń grzebienie płciowe pojawiają się w czwartym tygodniu rozwoju prenatalnego (89). Jednocześnie rozwijają się dwie pary przewodów płciowych, tj. przewody śródnerczowe i przyśródnerczowe. Przewody śródnerczowe (przewody Wolffa) biegną od śródnercza do kloaki i różnicują się w niektóre męskie narządy płciowe (67, 89, 108), natomiast przewody przyśródnerczowe (przewody Müllera) powstają w wyniku wpuklenia się mezotelialnych nabłonek pokrywających jamę ciała w ścianę boczną śródnercza (36, 67, 68, 89) i stanowią zawiązki żeńskich narządów płciowych, tj. jajowodu, macicy oraz górnej części pochwy (32, 36, 67, 89, 94, 108, 114).

Zadanie 1.

Przeprowadzone badania wykazały, że u 5-tygodniowych płodów samicy świni układ moczowo-płciowy składał się ze śródnerczy, przewodów śródnerczowych i grzebieni płciowych. Śródnercza posiadają wydłużony kształt i są ułożone symetrycznie w grzbietowej części jamy brzusznej. Na tym etapie rozwoju płodowego śródnercza są w pełni rozwinięte (średnia długość - 4,7 mm, szerokość około 1,1 mm). Przewody śródnerczowe leżą po przyśrodkowej stronie śródnerczy na całej ich długości i sięgają do kloaki. Grzebienie płciowe są wydłużone (średnia długości 1,6 mm) i mieszczą się po grzbietowo-przyśrodkowych stronach śródnerczy.

U płodów 7-tygodniowych śródnercza są nadal dobrze zachowane (średnia długość - 5,2 mm, szerokość 1,5 mm) i zlokalizowane poniżej nerek, które pojawiły się w grzbietowej części jamy brzusznej. Grzebienie płciowe w tym okresie życia płodowego są w trakcie różnicowania w owalne jajniki o średniej długości 1,8 mm. Po przyśrodkowej stronie śródnerczy zaobserwowano przewody przyśródnerczowe, przylegające do przewodów śródnerczowych. Obie pary przewodów otoczone są przez wspólną powłokę mezenchymalną. Przewody śródnerczowe posiadają w przybliżeniu trzykrotnie większą średnicę niż przewody przyśródnerczowe. Odcinki jajowodowe przewodów przyśródnerczowych są połączone ze śródnerczami, a ich końce czaszkowe wystają ponad linię jajników. Odcinki maciczne przewodów przyśródnerczowych pozostają połączone ze śródnerczem, natomiast w kierunku doogonowym łączą się ze sobą w kanał maciczno-pochwowy, umieszczony pomiędzy okrężnicą a cewką moczową. Jajniki są ułożone po grzbietowo-środkowej stronie doczaszkowych końców śródnerczy i leżą blisko odcinków jajowodowych przewodów przyśródnerczowych.

U płodów 10-tygodniowych nerki wyraźnie dominują w grzbietowej części jamy brzusznej, nad szczątkowymi śródnerczami, które są widoczne jedynie na kreskowym brzegu jajników. Przewody śródnerczowe nadal obserwuje się w bliskim sąsiedztwie przewodów przyśródnerczowych, ale ich średnica zmniejszyła się 3-krotnie w porównaniu z poprzednim okresem rozwojowym. Odcinki jajowodowe przewodów przyśródnerczowych otaczają powierzchnie boczne i końce jajowodowe jajników. Odcinki maciczne przewodów przyśródnerczowych są lekko pofałdowane. Owalne jajniki o średniej długości 2,1 mm są umieszczone po bokach grzbietowej części jamy brzusznej, tuż pod nerkami.

Barwienia immunohistochemiczne wykazały, że w pierwszym badanym okresie rozwojowym pojedyncze włókna PGP-pozytywne układają się wzdłuż grzebieni płciowych

i przewodów śródnerczowych, lecz nie wnikają one do wnętrza tych struktur, możliwe, że widoczne aksony są w fazie wydłużania i podążają do innych celów w jamie brzusznej.

W drugim badanym okresie, włókna nerwowe są widoczne głównie na brzegach mezenchymy otaczającej przewody przyśródnerczowe. Największą ich liczbę obserwowano na wysokości kanału maciczno-pochwowego i przebiegały one w cienkich pęczkach. Pojedyncze włókna nerwowe przenikają do mezenchymy. Mniej PGP-pozytywnych włókien nerwowych występuje w odcinku macicznym i jajowodowym przewodów przyśródnerczowych, natomiast w rozwijającym się jajniku nie są obecne. Na wysokości kanału maciczno-pochwowego widać nieliczne skupiska PGP-pozytywnych ciał komórek nerwowych, które są ułożone przeważnie do przodu i bocznie. Pojedyncze, widoczne są również na grzbietowo-bocznej stronie kanału maciczno-pochwowego. Prawdopodobnie w tym miejscu formuje się zwój przyszyjkowy. W trzecim badanym okresie rozwojowym wciąż nie wykazano obecności włókien nerwowych w rozwijającym się jajniku. Najwięcej PGP-pozytywnych włókien znajdowało się na wysokości kanału maciczno-pochwowego i coraz więcej z nich przenikało do mezenchymy, rozprzestrzeniając się równomiernie wokół przewodów śródnerczowych i przyśródnerczowych. W odcinkach macicznych i jajowodowych przewodów przyśródnerczowych występuje mniej włókien w mezenchymie, ale ich pęczki często widoczne są na jej obrzeżach. Na wysokości kanału maciczno-pochwowego znajdują się liczniejsze niż w poprzednim badanym stadium skupiska neuronów PGP-pozytywnych.

Powyższe badania, przeprowadzone po raz pierwszy na płodach świń, uwzględniły trzy różne okresy rozwoju i wykazały zależne od stadium różnice w unerwieniu rozwijających się wewnętrznych narządów rozrodczych u tego gatunku. Ponadto zmniejszanie się średnicy przewodów śródnerczowych względem rosnącej średnicy przewodów przyśródnerczowych, a także zwiększającej się liczby włókien nerwowych w mezenchymie może świadczyć o zależności tych procesów od siebie i ich wpływie na histologiczną przebudowę i dalszy rozwój narządów żeńskiego układu rozrodczego.

Zadanie 2.

Przy zastosowaniu techniki podwójnych barwień immunohistochemicznych wykazano, że w piątym tygodniu rozwoju płodowego pojedyncze włókna nerwowe, które biegą wzdłuż grzebieni płciowych, zawierają D β H lub VAcHt. Pojedyncze, krótkie włókna nerwowe, biegnące równoległe do przewodów śródnerczowych, są D β H-pozytywne. Na tym

etapie rozwoju prenatalnego nie obserwowano CGRP i SP we włóknach nerwowych zaopatrujących struktury przekształcające się w narządy płciowe.

U 7-tygodniowego płodu zaobserwowano, że większość włókien D β H- lub VAcHT-pozytywnych zlokalizowana jest na wysokości kanału maciczno-pochwowego, pojedyncze natomiast są widoczne na wysokości odcinków macicznego i jajowodowego przewodów przyśródnierzowych. Włókna D β H-pozytywne tworzą pojedyncze pasma lub pęczki zlokalizowane głównie na brzegu mezenchymy. Podobnie położone są włókna VAcHT-pozytywne, a nieliczne z nich przenikają do mezenchymy. Nie zaobserwowano D β H/VAcHT-pozytywnych aksonów. Skupiska komórek nerwowych zawierają D β H-pozytywne perikariony i D β H- lub VAcHT-pozytywne włókna nerwowe. Na tym etapie rozwoju nie wykazano obecności CGRP i SP we włóknach nerwowych zaopatrujących rozwijające się narządy płciowe.

U 10-tygodniowych płodów barwienia immunohistochemiczne uwidocznily znacznie większą liczbę włókien D β H- lub VAcHT-pozytywnych położonych głównie na wysokości kanału maciczno-pochwowego i mniejszą w odcinku macicznym i jajowodowym przewodów przyśródnierzowych. Natomiast nie obserwowano ich przy jajniku. Generalnie, włókna położone przy brzegu mezenchymy są D β H- lub VAcHT-pozytywne, przebiegają pojedynczo lub tworzą pęczki. Nieliczne włókna D β H- i wiele VAcHT-pozytywnych znajdowało się w mezenchymie, gdzie były równomiernie rozmieszczone. Nie zaobserwowano włókien nerwowych D β H/VAcHT-pozytywnych. Skupiska komórek nerwowych zawierały D β H-pozytywne perikariony i D β H- lub VAcHT-pozytywne włókna nerwowe. Na tym etapie rozwoju nie obserwowano CGRP i SP we włóknach nerwowych.

Powszechnie wiadomo, że u niedojrzałej płciowo świni jajnik (46), jajowód (18, 19), macica i pochwa (93, 126) są relatywnie intensywnie unerwione, a w ich ścianach znajduje się wiele włókien nerwowych. Włókna te zawierają różne substancje biologicznie czynne, w tym D β H, VAcHT, CGRP i SP. D β H i VAcHT głównie regulują napięcie mięśni w jajowodzie i macicy. Bogate unerwienie adrenergiczne okężnej warstwy mięśniowej jajowodu pośredniczy w skurczu tego narządu (18, 19), a unerwienie adrenergiczne macicy powoduje jej rozluźnienie (93, 126). Cholinergiczne włókna nerwowe, zaopatrujące warstwę mięśniową macicy, pośredniczą w jej skurczu (93, 126). Omawiane badania wykazały obecność włókien zawierających D β H i VAcHT w trzech badanych stadiach rozwojowych, ale ich fizjologiczne znaczenie nie jest jeszcze znane. Co więcej, u 10-tygodniowych płodów

świń włókna nerwowe nie zawierały CGRP ani SP, co sugeruje, że unerwienie czuciowe tych narządów rozwija się w późniejszych etapach rozwoju.

Uzyskane wyniki odpowiadają obserwacjom dotyczącym rozwoju unerwienia pęcherza moczowego u płodów ludzkich (57), gdzie D β H- lub VAcHT-pozytywne włókna nerwowe pojawiają się znacznie wcześniej niż te, zawierające CGRP i/lub SP (57). Włókna adrenergiczne i cholinergiczne docierają do tkanek docelowych wyraźnie wcześniej niż nerwy czuciowe (31, 57, 82). Omawiana praca jest pierwszą, która opisuje rozwój unerwienia adrenergicznego, cholinergicznego i sensorycznego (SP/CGRP-pozytywne) kształtujących się żeńskich narządów rozrodczych u świni w różnych okresach życia płodowego.

Zwój przyszyjkowy u samicy świni w czasie rozwoju prenatalnego, morfologia oraz immunohistochemiczna charakterystyka.

Realizacja zadania 3., 4. i 5. miała na celu zbadanie rozwoju zwoju przyszyjkowego (PCG) u 5-, 7- i 10-tygodniowych płodów samicy świni z uwzględnieniem zmian morfologicznych oraz immunohistochemicznego charakteru dojrzewających neuronów w poszczególnych okresach życia płodowego. Komórki nerwowe zwoju zostały przeanalizowane pod kątem obecności klasycznych neurotransmiterów dla struktur adrenergicznych (D β H), cholinergicznych (VAcHT) i czuciowych (CGRP, SP) oraz innych substancji biologicznie aktywnych, takich jak NPY, SOM, VIP, GAL i NOS. Obserwacje morfologiczne przy użyciu mikroskopu konfokalnego objęły 19 płodów 5-tygodniowych, 13 płodów 7-tygodniowych i 14 płodów 10-tygodniowych, natomiast liczenie neuronów, określenie udziału procentowego poszczególnych populacji neuronalnych oraz analiza statystyczna została przeprowadzona w oparciu o wyniki uzyskane od pięciu płodów dla każdej grupy wiekowej. (Artykuł 4.2.2).

Zwoje miedniczne stanowią ważne centrum obwodowego autonomicznego układu nerwowego, a włókna zazwojowe neuronów tych zwojów zaopatrują końcowy odcinek układu pokarmowego i narządy układu moczowo-płciowego (9, 49, 50, 79, 92, 97). Zwoje te tworzą duże struktury, jak również obecne są mniejsze skupiska neuronów, które występują na terenie jamy miednicznej i w ścianach narządów (49, 56, 80, 92). Wcześniejsze badania, przeprowadzone na niedojrzałych płciowo samicach świń, wykazały, że na terenie jamy miednicznej znajduje się wiele rozsianych zwojów (75, 93, 125, 126), jedynie w okolicy

przejścia maciczno-pochwowego neurony zgrupowane są w postaci dużego skupiska zwanego zwojem przyszyjkowym (75, 93).

Jak wspomniano we wstępie, rozwój zwojów miednicznych (w tym procesy migracji, proliferacji i różnicowania się ich komórek nerwowych) został najmniej poznany. Z dostępnej literatury wiadomo jedynie, że u myszy (128) lędźwiowo-krzyżowe NCC migrują w kierunku grzbietowej części śródnercza i jednocześnie rozpoczyna się różnicowanie neuronalne. Następnie migrujące NCC, kierując się w stronę jelita tylnego, tworzą zawiązek splotu miednicznego między jelitem tylnym a zatoką moczowo-płciową (2, 123, 128, 129). W tym miejscu neurony zaczynają tworzyć większe skupiska i jednocześnie wypustki niektórych z nich wnikają do mezenchymy zatoki moczowo-płciowej (44, 128). Ten intensywny proces migracji, różnicowania neuronów i tworzenia zwojów splotu miednicznego u myszy rozpoczyna się około 10,5 dpc i trwa nie krócej niż do 15,5 dpc (2, 123, 128, 129). Proces ten śledzono przy użyciu markerów panneuronalnych Hu-C/D (58, 128), TuJ1 lub PGP9.5 (128).

Jak dotąd omawiane dane są pierwszymi obserwacjami, dotyczącymi płodów świni, gatunku o istotnej wartości w badaniach biomedycznych.

Zadanie 3.

Przeprowadzone badania wykazały, że między piątym a dziesiątym tygodniem rozwoju prenatalnego świni obraz PCG ulega dynamicznym zmianom, ale jest wciąż odmienny pod względem morfologicznym od analogicznej struktury, występującej u osobnika po urodzeniu. W piątym tygodniu rozwoju PCG nie jest jeszcze widoczny. Na tym etapie przy użyciu barwienia immunohistochemicznego w kierunku PGP-9.5 obserwowane są struktury nerwowe w postaci pęczków włókien nerwowych wraz z ciałami niedojrzałych neuronów, migrujących od zwojów pnia współczulnego w kierunku jamy ciała. Podobne obserwacje, dotyczące formujących się struktur nerwowych, opisano u myszy w 10.5 dpc (44, 128). Pojedyncze PGP-pozytywne włókna i nieliczne neurony występują wzdłuż grzebieni płciowych i przewodów śródnerczowych. Widoczne neurony głównie są owalnego kształtu z dużym jądrem i niewielką ilością cytoplazmy. Średnica tych komórek nerwowych wynosi 6-11 μm , ale większość z nich ma 7-9 μm .

U płodów 7-tygodniowych widoczna jest zwarta, o nieregularnym kształcie, położona zewnętrznie po obu stronach kanału maciczno-pochwowego i tylnej części odcinka macicznego przewodów przyśródnerczowych struktura nerwowa. Przylega ona do mezenchymy przewodów i zawiera PGP-pozytywne komórki nerwowe. Należy nadmienić,

że wspomniana część odcinka macicznego przewodów przyśródnerczowych jest jeszcze niezrośniętym odcinkiem kanału maciczno-pochwowego, co wynika z obserwacji morfologicznych. Uzyskane dane silnie sugerują, że PCG i splot miedniczny tworzą się na tym etapie rozwoju. Co więcej, badania dotyczące rozwoju żeńskich narządów płciowych u płodów świni (zadanie badawcze 1. i 2.) wykazały, że na tym etapie rozwoju niektóre włókna nerwowe PGP-pozytywne przenikają przez mezenchymę przewodów przyśródnerczowych na całej ich długości. Włókna nerwowe, które zaobserwowano w mezenchymie kanału maciczno-pochwowego, to (z dużym prawdopodobieństwem) aksony neuronów pochodzących z rozwijającego się PCG. Liczba neuronów zlokalizowanych w rozwijającym się PCG wynosi 3144 ± 213 . Ponadto, na przekroju tworzącego się układu rozrodczego małe PGP-pozytywne skupiska neuronów są widoczne na granicy mezenchymy kanału maciczno-pochwowego i zawierają od 3-4 do 20 neuronów i leżą głównie brzuszno-bocznie, ale niektóre z nich widać po stronie grzbietowo-bocznej. Neurony zlokalizowane w formującym się PCG mają owalny kształt i posiadają duże jądro. Średnica ciał komórek nerwowych mieści się w przedziale 7-11 μm , ale większość z nich mieści się w przedziale 8-10 μm . Neurony widoczne w małych skupiskach na krawędzi mezenchymy kanału maciczno-pochwowego są nieco mniejsze (7-9 μm).

U 10-tygodniowych płodów obserwowane są dalsze zmiany w rozwijającym się PCG, który stał się mniej jednolitą grupą neuronów w porównaniu z poprzednim badanym okresem rozwoju prenatalnego. PCG wydaje się podzielony na kilka większych i wiele małych skupisk neuronów, bardziej rozciągnięty i rozbudowany wzdłuż całego kanału maciczno-pochwowego, osiagając odcinek maciczny przewodu przyśródnerczowego. Rozwijający się PCG jest zlokalizowany zewnątrz i bocznie względem mezenchymy przewodów przyśródnerczowych, a niektóre skupiska neuronów połączone są z mezenchymą. W tym okresie również, jak wiadomo z poprzednich badań (zadanie badawcze 1. i 2.), liczne PGP-pozytywne włókna nerwowe występują na wysokości kanału maciczno-pochwowego i w mniejszej liczbie na wysokości odcinków macicznych i jajowodowych przewodów przyśródnerczowych. Wiele z tych włókien wnika do mezenchymy, gdzie są ułożone regularnie. Liczba neuronów umiejscowionych w formującym się zwoju wynosi około 4121 ± 259 . Niektóre mniejsze skupiska neuronów (15-30 neuronów) są widoczne po grzbietowej i brzusznej stronie mezenchymy. Średnica neuronów waha się od 9 do 17 μm , ale większość z nich mieści się w przedziale 11-15 μm . Neurony widoczne na brzegu mezenchymy kanału maciczno-pochwowego są mniejsze (7-9 μm).

Porównując rozwój prenatalny człowieka, myszy i świni, wydaje się, że splot miedniczny zaczyna się rozwijać między 1/3 a połową okresu płodowego. U męskich płodów ludzkich komórki nerwowe w jamie ciała w pobliżu rozwijającej się prostaty były widoczne w trzynastym tygodniu życia płodowego (45), a tydzień później skupiska neuronów obserwowano w mezenchymie kanału maciczo-pochwowego u płodów żeńskich. (83). U myszy, między 11,5 a 13 dpc, NCC migrujące do jelita tylnego łączą się, tworząc zawiązek splotu miednicznego między jelitem tylnym a zatoką moczowo-płciową (2, 123, 128, 129), a następnie niektóre neurony i włókna nerwowe wchodzi do mezenchymy zatoki moczowo-płciowej (44, 128).

Liczba neuronów splotu miednicznego wzrasta podczas rozwoju prenatalnego, co potwierdziły wcześniejsze badania na gryzoniach (56) i nadal rośnie po urodzeniu (56, 128, 134). Niniejsze badania wykazały, że liczba neuronów PCG, wchodzących w skład splotu miednicznego, również uległa zmianie z około 3144 u płodów 7-tygodniowych do 4121 u płodów 10-tygodniowych i przypuszczalnie liczba ta ulegnie co najmniej podwojeniu, jak zauważono u myszy (134). W przypadku zwoju przyszyjkowego u prosiąt (93) nie było możliwe policzenie wszystkich neuronów PCG ze względu na ich rozproszenie i trudność w określeniu, czy wybrane grupy neuronów należą do PCG, czy też tworzą mniejsze skupiska splotu miednicznego. W związku z tym, pomimo liczenia komórek nerwowych, zwłaszcza w trzecim badanym okresie, w którym formujący się PCG był podzielony na mniejsze skupiska komórek nerwowych, trudno jest ocenić, czy wszystkie wzięte pod uwagę neurony należały do PCG, czy też część z nich (szczególnie ta, leżąca na obwodzie) mogła stanowić oddzielne struktury nerwowe splotu miednicznego. Jednak powyższe dane pozwoliły zaobserwować, w jakim stopniu liczba komórek nerwowych ulega zmianie. Wiadomo również, że w okresie prenatalnym splot miedniczny ulega reorganizacji, tzn. niektóre komórki nerwowe zanikają w wyniku procesu apoptozy, a na ich miejsce pojawiają się nowe (107, 128, 129). Zjawisko to jest związane z intensywnym rozwojem zwojów splotu miednicznego, w którym różnicowanie neuronalne jest procesem trwającym równoległe z migracją krzyżowych NCC, a nie sekwencyjną serią zdarzeń, zachodzącą po połączeniu się krzyżowych NCC (128). Fakt ten może również wyjaśniać zróżnicowanie średnic neuronów w trakcie rozwoju, tj. 7-9 μm w pierwszym, 8-10 μm w drugim i 11-15 μm w trzecim badanym okresie.

Zadanie 4.

Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały, że u 5-tygodniowych płodów pojedyncze neurony PGP-pozytywne, widoczne na wysokości tylnej części przewodów śródnerczowych, zawierają D β H lub VAcHt. Neurony zawierające D β H są liczniejsze niż VAcHt-pozytywne. Delikatne włókna nerwowe rozmieszczone wokół lub obok ciał komórek nerwowych w większości zawierają VAcHt.

U 7-tygodniowych płodów neurony PGP-pozytywne zawierają D β H ($36,40 \pm 1,63\%$) lub VAcHt ($17,31 \pm 1,13\%$). Neurony D β H-pozytywne widoczne są na całym obszarze kształtującego się PCG i tworzą one mniejsze lub większe skupiska. Neurony VAcHt-pozytywne występują głównie w grzbietowo-tylnej części zwoju natomiast w przedniej i środkowej części znajduje się ich zdecydowanie mniej. Zaobserwowano również obecność pojedynczych neuronów D β H/VAcHt-pozytywnych. Bardzo bogata sieć włókien nerwowych występuje w tylnej i mniej gęsta w środkowej części zwoju. Włókna te wykazują immunoreaktywność głównie względem VAcHt i otaczają VAcHt-, D β H/VAcHt- i niektóre D β H-pozytywne perykariony, natomiast mniej włókien zawiera D β H i otaczają one przeważnie komórki D β H-pozytywne lub przbiegają w pęczkach na zewnątrz zwoju.

U 10-tygodniowych płodów PGP-pozytywne neurony, zlokalizowane w tworzącym się PCG, zawierają D β H ($40,26 \pm 0,73\%$) i VAcHt ($30,73 \pm 1,34\%$). Neurony D β H-pozytywne są nieregularnie rozmieszczone, głównie w przedniej części zwoju i tworzą grupy do kilkudziesięciu komórek. Na tym etapie rozwoju obserwowane są również komórki D β H-pozytywne o niskiej intensywności fluorescencji. Małe skupiska neuronów D β H-pozytywnych są widoczne w mezenchymie przewodów przyśródnerczowych. Neurony VAcHt-pozytywne zauważa się znacznie częściej w tylnej części zwoju, a ich liczba zmniejsza się w kierunku doczaszkowym. Neurony te tworzą duże skupiska, natomiast pojedyncze obserwowane są na granicy mezenchymy. Neurony D β H/VAcHt-pozytywne wykazywały niski poziom intensywności fluorescencji dla D β H. Większość włókien nerwowych wykazywała immunoreaktywność względem VAcHt. Włókna te tworzą bogatą sieć, która otacza głównie neurony VAcHt-pozytywne i D β H-negatywne, a rzadziej D β H-pozytywne. W części przedniej zwoju występuje niewiele włókien nerwowych VAcHt-pozytywnych. Mniej włókien zawiera D β H i głównie otaczają one komórki nerwowe D β H-pozytywne lub tworzą pęczki wewnątrz zwoju.

Z dostępnej literatury wiadomo, że u niedojrzałych płciowo samic świń PCG zawiera około 23% neuronów adrenergicznych i 77% cholinergicznym (93). U innych gatunków

wspomniane odsetki są nieco odmienne (85, 86, 124). Stwierdzono również, że większość neuronów adrenergicznych zlokalizowana jest w części czaszkowej PCG, a ich liczba stopniowo maleje w kierunku doogonowym, gdzie większość neuronów ma charakter cholinergiczny (93, 125, 126). Ten wzorzec rozmieszczenia neuronów można zaobserwować już w siódmym tygodniu rozwoju prenatalnego, gdzie nieco więcej neuronów zawierających VAcHT znajduje się w tylnej części zwoju, a w przypadku płodów 10-tygodniowych jest nawet silniej zaznaczony. Istnienie tych dwóch „regionów” w zwoju, tj. adrenergicznego i cholinergicznego, jest prawdopodobnie związane z pochodzeniem włókien przedzwojowych, z których włókna współczulne, dochodzą do PCG głównie nerwem podbrzusnym od strony doczaszkowej zwoju, podczas gdy przywspółczulne aksony przedzwojowe dochodzą nerwem miednicznym położonym bardziej doogonowo (55, 93).

Wiadomo, że w PCG świni nie występują neurony nieadrenergiczne i niecholinergiczne (93). Realizacja zadania 4. wykazała nie tylko odmienny obraz w kodowaniu chemicznym neuronów między płodami a niedojrzałymi płciowo zwierzętami, ale również różnice między 7- i 10-tygodniowymi płodami w procentowym udziale głównych populacji neuronalnych, co wskazuje na intensywny rozwój PCG w tym okresie rozwoju (płody 7-tygodniowe - 36,40% D β H- i 17,31% VAcHT-pozytywnych; płody 10-tygodniowe - 40,26% D β H- i 30,73%). Biorąc pod uwagę odsetek neuronów zawierających wspomniane markery, można założyć, że niektóre neurony tworzącego się zwoju są wciąż neurochemicznie nieokreślone, stąd wyższy odsetek neuronów adrenergicznych u płodów w porównaniu z młodymi osobnikami i obserwowana stale rosnąca liczba neuronów cholinergicznym. Ponadto, badanie to ujawniło znaczny wzrost liczby neuronów cholinergicznym między siódmym a dziesiątym tygodniem rozwoju prenatalnego, przy niewielkim wzroście liczby komórek D β H-pozytywnych i jednoczesnym pojawianiu się neuronów D β H-pozytywnych o niskiej intensywności fluorescencji. Obserwacje te mogą również wskazywać na postępującą zmianę fenotypu neuronów pod względem syntetyzowanego neuroprzekaźnika i tłumaczyć obecność neuronów D β H/VAcHT-pozytywnych w badanych stadiach rozwojowych. W odniesieniu do zwojów splotu miednicznego wiadomo tylko, że wzrost aksonów neuronów współczulnych u starszych płodów i noworodków myszy lub dojrzałych płciowo szczurów zależy od NGF (in vitro), natomiast neuronów przywspółczulnych od neurturyny, ale nie od NGF (78, 133, 134). Niemniej jednak mechanizmy regulujące fenotyp neuroprzekaźnikowy

miednicznych neuronów współczulnych i przywspółczulnych nie zostały jeszcze zidentyfikowane (133, 134).

Zadanie 5.

W badaniach dotyczących występowania innych niż podstawowe neurotransmitery, ale ważne z racji pełnionych funkcji fizjologicznych w układzie moczowo-płciowym i tylnym odcinku układu pokarmowego, uwzględniono obecność następujących substancji biologicznie aktywnych w neuronach PCG: NPY, SOM, VIP, GAL, NOS, CGRP i SP. W badanych okresach rozwojowych nie stwierdzono występowania GAL, NOS, CGRP i SP, natomiast immunoreaktywność neuronów PCG względem NPY, SOM lub VIP pojawiła się dopiero u 10-tygodniowych płodów.

NPY-pozytywne komórki nerwowe ($33.24 \pm 1.27\%$) stanowią najliczniejszą grupę w porównaniu z SOM- czy VIP-pozytywnymi perykarionami. NPY-pozytywne neurony zawierają jednocześnie D β H i najczęściej są widoczne na obrzeżach zwoju. Pojedyncze NPY-pozytywne neurony również wykazują immunoreaktywność względem VAcHT i VIP. Duża liczba NPY-pozytywnych włókien nerwowych jest widocznych na obszarze całego zwoju. Natomiast niewiele włókien nerwowych widać w mezenchymie kanału maciczno-pochwowego przewodu przyśródnerczowego. Zwykle zawierają one również D β H.

SOM-pozytywne neurony ($23.6 \pm 0.44\%$) tworzą małe skupiska i położone są przeważnie w zewnętrznych rejonach zwoju. Większość tych neuronów zawiera VAcHT, mniej liczne - D β H, a pojedyncze komórki są pozytywne względem VIP. Neurony SOM-pozytywne nie wykazują immunoreaktywności względem NPY. Generalnie, SOM/VAcHT-pozytywne włókna nerwowe otaczają SOM-pozytywne neurony.

VIP występuje w około $22.9 \pm 1.13\%$ wszystkich neuronów w zwoju. Neurony te znajdują się głównie w obszarach zwoju, gdzie obecne są VAcHT-pozytywne komórki nerwowe. VIP-pozytywne neurony w większości zawierają VAcHT, a pojedyncze NPY, SOM lub D β H. VIP-pozytywne neurony wykazują niski poziom intensywności fluorescencji. Włókna nerwowe VIP-pozytywne głównie otaczają VIP/VAcHT- lub VAcHT-pozytywne perykariony. Wiele włókien VIP/VAcHT-pozytywnych widocznych jest w mezenchymie kanału maciczno-pochwowego przewodu przyśródnerczowego.

U niedojrzałych płciowo świń 75% neuronów PCG zawiera NPY, 67% SOM a wszystkie neurony cholinergiczne są VIP-pozytywne (około 77%) (Podlasz and Wasowicz, 2008). U płodów NPY występuje w neuronach adrenergicznych i cholinergicznych, SOM

głównie w cholinergicznym, a VIP jedynie w tych, które zawierają jednocześnie VAcHT. W 10-tygodniu rozwoju płodowego analizy skrawków stycznych wykazały obecność neuronów DβH/VIP-, DβH/SOM- lub tylko SOM-pozytywnych. Taki sposób kodowania neuronów PCG nie był zauważony u niedojrzałej płciowo świni (Podlasz and Wasowicz, 2008). Powyższe spostrzeżenia ewidentnie wskazują, że neurony PCG u płodu są w trakcie definiowania swojego neuronalnego fenotypu.

GAL, NOS, CGRP i SP nie występują w żadnym badanym okresie rozwojowym.

W zwoju przyszyjkowym niedojrzałych płciowo świń GAL jest obecna tylko w małych, adrenergicznych neuronach, przypuszczalnie interneuronach. GAL hamuje wydzielanie noradrenaliny poprzez hyperpolaryzację błony komórkowej, wynikiem tego jest możliwość moderowania funkcji neuronów adrenergicznych przy udziale tej substancji (98). 25% neuronów PCG u młodych świń zawiera nNOS i wszystkie są neuronami cholinergicznymi (93). W żeńskim układzie rozrodczym tlenek azotu m. in. przyczynia się do relaksacji mięśni macicy (126). Biorąc pod uwagę procesy zachodzące w PCG u 10-tygodniowych płodów (prolifracja, dojrzewanie neuronów), jak również fakt, że narządy układu moczowo-płciowego w tym okresie zaczynają intensywnie się rozwijać, udział GAL i NOS na tym etapie nie wydaje się potrzebny. Włókna nerwowe zawierające SP i CGRP występują licznie w PCG niedojrzałych płciowo świń i są rozmieszczone głównie wokół neuronów adrenergicznych. Prawdopodobnie są to włókna czuciowe. Jak wiadomo z wcześniejszych badań na płodach, dotyczących np. unerwienia pęcherza moczowego u człowieka (57), czy żeńskiego układu rozrodczego (Zadanie badawcze 2.) lub serca (Zadanie badawcze 7.) u świni, autonomiczny układ nerwowy rozwija się zdecydowanie wcześniej niż unerwienie czuciowe.

Powyższe badania wykazały również, że niewiele DβH/NPY- oraz bardzo dużo VAcHT/VIP-pozytywnych włókien nerwowych penetrowało mezenchymę kanału maciczno-pochwowego przewodu przyśródnerczowego. Tak neurochemicznie kodowane włókna nerwowe głównie pełnią rolę naczynioruchową w układzie rozrodczym (126), lecz nie ma informacji na temat funkcji tych włókien u płodu. Przypuszczalnie są to aksony perykarionów już określonych neurochemicznie, które osiągnęły swój narząd docelowy i pojawienie się ich może przyczyniać się do zapoczątkowania następnej fazy w rozwoju narządów żeńskiego układu rozrodczego. Wcześniejsze obserwacje dotyczące płodów świni (Zadanie badawcze 1. i 2.) wykazały, że u 10-tygodniowych płodów (zaczyna się ostatnia 1/3 rozwoju prenatalnego) występują dynamiczne zmiany w rozwoju unerwienia każdego z odcinków przewodów

przysródnerczowych (Zadanie badawcze 1. i 2.) oraz widoczne zmiany zaznaczają się również w liczbie i kodowaniu immunohistochemicznym neuronów PCG. W tym okresie rozwoju zaznaczają się także wyraźne zmiany strukturalne narządów rozrodczych, co zaobserwowano u płodów kotek (94). Począwszy od około 42dpc (druga połowa ciąży) aż do zakończenia życia płodowego rozpoczyna się okres różnicowania tkanek polegający na rozwoju nabłonka, błony śluzowej i mięśniowej jajowodu oraz macicy (94). Ponadto w kilku publikacjach (4, 45) podano, że niektóre neuropeptydy – NPY, SOM lub VIP pojawiają się w strukturach nerwowych układu moczowo-płciowego dopiero w drugiej połowie ciąży, a inne, w tym GAL, NOS, CGRP czy SP, w okresie okołoporodowym lub później. Jednak wciąż nie wiadomo, jaką rolę odgrywają te substancje w określonej fazie rozwoju w strukturach nerwowych u płodów.

Niewiele wiadomo o czynnikach i mechanizmach regulujących powstawanie i rozwój splotu miednicznego, w tym PCG świni. Na podstawie istniejącej wiedzy, możliwe jest, że artemina (131), neurotrofina-3 (69) lub endothelina-3 (76), GDNF czy też neurturyna mają wpływ na tworzenie się PCG, wzrastanie i wnikanie aksonów pochodzących z PCG do narządów układu moczowo-płciowego.

Istniejąca wiedza pozwala przypuszczać, że brak jakiegoś czynnika może powodować nieprawidłowości rozwojowe i mieć negatywny wpływ na późniejsze unerwienie narządów moczowo-płciowych, co ostatecznie może wywoływać zaburzenia w rozwoju i późniejszym funkcjonowaniu tego układu. Należy wspomnieć, że opisano wiele anomalii związanych z przewodami przysródnerczowymi (przewody Müllera), takich jak nieprawidłowo wykształcona macica, agenezja lub duplikacja macicy i pochwy. Większość zaburzeń przewodów przysródnerczowych ma podłoże genetyczne, ale nie wiemy, czy w niektórych przypadkach ma to związek z nieprawidłowo rozwijającym się układem nerwowym, zwłaszcza PCG, który stanowi ważne źródło unerwienia macicy. Rozpatrując tę kwestię z innej strony, można stwierdzić, że operacje chirurgiczne narządów miednicy i okolicznych tkanek, w tym ich usunięcie (standardowa owariohisterektomia u zwierząt, problemy onkologiczne), często powodują uszkodzenia struktur splotu miednicznego. Zwykle wywołuje to nieprawidłowości w funkcjonowaniu sąsiednich narządów, np. usunięcie PCG ma znaczący, destrukcyjny wpływ na występowanie zjawisk związanych z fazami cyklu w pochwie (119) czy nietrzymanie moczu. Biorąc pod uwagę wspomniane fakty, wydaje się, że warto poznać plastyczność i zmienność układu nerwowego podczas rozwoju prenatalnego. Badania te pozwolą lepiej zrozumieć procesy związane z tworzeniem się struktur nerwowych

oraz możliwości ich odnowy i odbudowy, co jest naturalnym procesem w rozwoju prenatalnym. Rozród jest ważnym elementem hodowli zwierząt. Dobrze ukształtowany i funkcjonujący układ rozrodczy to gwarancja posiadania zdrowego potomstwa.

Podsumowując, po raz pierwszy opisano morfologię rozwijającego się PCG u płodów świni w trzech etapach rozwoju. Odnotowano również dynamiczne zmiany dotyczące liczby neuronów i ich rozmiarów, a także zmiany w kodowaniu immunohistochemicznym dojrzewających neuronów. Badania te poszerzają relatywnie ubogą wiedzę odnoszącą się do rozwoju unerwienia narządów układu moczowo-płciowego, zwłaszcza u świń.

Struktury nerwowe serca u 10-tygodniowego płodu świni.

Realizacja zadania 6. i 7. miała na celu określenie rozmieszczenia i chemicznego kodowania struktur nerwowych w sercu 10-tygodniowego płodu świni. Do badań wykorzystano serca od pięciu płodów. (Artykuł 4.2.3)

Rozwój serca jest procesem wieloetapowym (35, 38). Komórki progenitorowe serca pojawiają się na początku trzeciego tygodnia rozwoju płodowego u człowieka, a u świni w około czternastym dniu po zapłodnieniu (89). Komórki te pierwotnie znajdują się w epiblaście, następnie migrują przez smugę pierwotną, od jej końca czaszkowego do warstwy trzewnej płytki bocznej mezodermy i tworzą pierwotne pole sercowe (PHF) położone doczaszkowo względem fałdów nerwowych (38, 54). Z komórek PHF wykształca się przedsionki, komora lewa i fragment komory prawej (38, 54). Z komórek wtórnego pola sercowego (SHF), powstałego w mezodermie trzewnej w tylnej części gardła, tworzy się pozostała część prawej komory i droga odpływu, ale również SHF ma udział w tworzeniu przedsionków (38, 54). Pole sercotwórcze powstaje z komórek endodermy przedniej, znajdującej się poniżej komórek progenitorowych serca. Bierze ono udział w tworzeniu mioblastów i naczyń krwionośnych (35, 38). Bardzo ważnym i niezbędnym do prawidłowego ukształtowania się serca etapem jest lateralizacja, przypadająca na okres gastrulacji (16 – 18 dzień rozwoju u człowieka) (35, 102). Oprócz stron ciała zarodka ustala się również prawa i lewa strona serca. Lateralizacji ulegają komórki SHF, pod wpływem tego samego szlaku sygnałowego, który dotyczy ciała zarodka. Konsekwencją zaburzeń tego procesu jest powstanie wad serca, np. nieprawidłowości w budowie przegrody międzyprzedsionkowej czy międzykomorowej, przełożenie wielkich pni lub zwężenie zastawki płucnej. Dalszy,

wieloetapowy proces rozwoju serca prowadzi do wykształcenia się czterech jam serca, co następuje około siódmego tygodnia rozwoju u człowieka (35, 64).

Zadanie 6.

W świetle przeprowadzonych badań można stwierdzić, że w sercu 10-tygodniowego płodu świni znajdują się typowe struktury nerwowe dla tego narządu. Barwienie znacznikiem struktur nerwowych PGP wykazało, że większość skupisk komórek nerwowych znajduje się w nasierdziu, wokół ujścia aorty, pnia płucnego i żył głównych. W zwoju zatokowo-przedsionkowym odnotowano największą liczbę neuronów (262 ± 12). Nieznacznie mniej komórek PGP-pozytywnych (236 ± 13) obserwowano w zwoju przedsionkowo-komorowym. Neurony tworzące oba zwoje są głównie owalne, posiadają duże jądro, a ich średnica mieści się w przedziale $16-20 \mu\text{m}$. Wokół początkowego odcinka aorty wstępującej zauważono liczne rozproszone skupiska, składające się zazwyczaj z kilkunastu komórek nerwowych. Pozostałe, zawierające od 10 do 30 neuronów, są rozmieszczone w okolicy tętnicy płucnej, a mniejsze, składające się z 5-10 neuronów, w pobliżu naczyń żylnych. Wiele drobniejszych skupisk neuronów (6-10) widocznych jest w nasierdziu obydwu przedsionków, w pobliżu naczyń wieńcowych. Na terenie całego serca zaobserwowano 117 ± 21 małych skupisk neuronów, a ich średnica mieściła się w przedziale $11-17 \mu\text{m}$. Wcześniejsze badania wykazały, że w sercach kilkutygodniowych prosiąt znajduje się średnio 359 ± 178 neuronów w dużych zwojach (6), a liczba małych zwojów na terenie całego serca wynosi 361 ± 52 , z czego najwięcej widocznych jest w ścianie lewego przedsionka oraz lewej i prawej komory serca (6).

Barwienie immunohistochemiczne w kierunku PGP wykazało, że w ścianie wszystkich jam serca płodu znajduje się bardzo dużo pęczków włókien nerwowych. Najbogatsza sieć włókien PGP-pozytywnych znajduje się w okolicach podstawy serca, w pobliżu ujść jego głównych naczyń. Na przebiegu pęczków włókien nerwowych obserwuje się czasami małe skupiska lub pojedyncze komórki nerwowe. Większość pęczków włókien nerwowych jest widocznych w nasierdziu, mniej liczne występują w rozwijającej się mięśniówce serca i wsierdziu. Generalnie wiele z nich znajduje się w nasierdziu przedsionków, mniej natomiast w nasierdziu komór. Wiele włókien nerwowych PGP-pozytywnych jest rozmieszczonych we wsierdziu, w przegrodzie międzyprzedsionkowej, a niewiele w przegrodzie międzykomorowej. Cieńsze pęczki lub pojedyncze włókna nerwowe występują w mięśniówce przedsionków i komór serca. Według Crick'a i współpracowników (17) gradient gęstości

włókien nerwowych u kilkutygodniowych prosiąt zmienia się od licznie występujących w nasierdziu i wsierdziu do mniej licznych w mięśniówce serca. Biorąc pod uwagę nasierdzie, gradient gęstości włókien nerwowych wzrastał od komór w stronę przedsionków, w mięśniówce serca – od przedsionków do komór, a we wsierdziu od prawej do lewej strony, z czego najwięcej włókien występowało na terenie prawej komory, a najmniej na terenie lewego przedsionka.

Uzyskane wyniki u płodów świni dowodzą, że proces dojrzewania, migracji i proliferacji neuronów na tym etapie rozwoju nie został jeszcze zakończony. Na ogół znacznie mniej włókien nerwowych obserwuje się we wsierdziu i mięśniówce serca. Sploty i włókna nerwowe są przeważnie ułożone w nasierdziu obu przedsionków i znacznie rzadziej odnotowuje się ich obecność w okolicy komór, co stanowi wyraźną różnicę między sercem płodu a sercem osobnika po urodzeniu. Najprawdopodobniej podczas badanego etapu rozwoju prenatalnego aksony ulegają wydłużeniu i wnikają w tkankę serca. Ponadto, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można domniemywać, że unerwienie serca u świni rozwija się wolniej niż u człowieka. Zaobserwowano, że u 24-tygodniowych płodów ludzkich (mniej więcej proporcjonalnie podobny wiek do tego, który dotyczy płodów świni) konfiguracja unerwienia serca odpowiada już unerwieniu serca dorosłego człowieka (31). Może to być związane z bardziej „obfitym” unerwieniem serca świni w porównaniu z sercem człowieka, co stanowi również dużą rozbieżność morfologiczną serc obu gatunków i może stwarzać problemy związane z funkcją dawcy serca przez transgeniczną świnię (16, 17, 100, 127).

Zadanie 7.

Podwójne barwienie immunohistochemiczne ujawniły, że większość neuronów PGP-pozytywnych wykazuje immunoreaktywność względem VACHT i CGRP, a pojedyncze komórki nerwowe są D β H-pozytywne. W zwojach zatokowo-predsionkowym i przedsionkowo-komorowym 10-tygodniowych płodów świni wiele neuronów PGP-pozytywnych zawiera VACHT (odpowiednio 53,8% i 51,7%), mniej liczne są CGRP-pozytywne (13,2 % i 13,9%), a nieliczne zawierają D β H (odpowiednio 1,6% i 1,2%). Pojedyncze neurony jednocześnie wykazują immunoreaktywność względem DBH i VACHT. W mniejszych skupiskach komórek nerwowych 41,22% neuronów zawiera VACHT, 9,42% D β H a pojedyncze CGRP.

Większość włókien nerwowych, przebiegających w nasierdziu, zaopatrujących mięśniówkę serca i obserwowanych we wsierdziu, jest D β H- a mniej VACHT-pozytywnych.

Nie zauważono włókien DBH/VACHT-pozytywnych. Niewielka część aksonów w nasierdziu i mięśniówce serca wykazuje immunoreaktywność względem CGRP, pojedyncze natomiast są widoczne we wsierdziu wszystkich komór serca. Nie stwierdzono kolokalizacji CGRP z innymi badanymi substancjami we włóknach nerwowych zaopatrujących serce płodu.

Analiza wzoru chemicznego kodowania włókien nerwowych, obecnych w sercu płodu w zakresie VACHT, DBH czy CGRP, wykazała, że jest on nieco inny niż u świni w okresie postnatalnym (16, 17). Wyniki uzyskane w zadaniu 7. wskazują, że u dziesięcioletniogodniowych płodów większość neuronów sercowych zawiera VACHT, a tylko nieliczne są D β H-pozytywne, co stanowi różnicę w unerwieniu między sercem płodu a prosiąt, u których neurony zawierające D β H stanowią dość liczną populację [16]. Wiadomym jest, że komórki grzebieni nerwowych (wstęp) biorą udział w tworzeniu splotu sercowego i zwojów sercowych. Komórki z grzebieni nerwowych tułowia przyczyniają się do formowania nerwów współczulnych, zaopatrujących serce. Znanym jest również fakt, że prawidłowa ontogeneza przywspółczulnego i wewnętrznego unerwienia serca poprzedza ontogenezę unerwienia współczulnego (17, 31, 35, 87). W sercu ludzkiego płodu zaobserwowano, że unerwienie cholinergiczne było prezentowane w dwunastym tygodniu, a adrenergiczne nie zostało zidentyfikowane do osiemnastego tygodnia rozwoju (20, 31, 51, 88). Odnosząc się do powyższych danych wyraźnie widać, że u 10-tygodniowych płodów świni autonomiczne unerwienie serca nadal się kształtuje. Wśród neuronów sercowych szczura, świnki morskiej czy człowieka (64) można wyróżnić kilka podpopulacji neuronów. Perykariony cholinergiczne są największą z nich. Neurostymulacja tych komórek powoduje hiperpolaryzację kardiomiocytów i przedzwojowe hamowanie neuroprzekaźników współczulnych, co prowadzi do spowolnienia akcji serca (64). Drugą grupę stanowią neurony cholinergiczno-adrenergiczne, z acetylocholiną jako neuroprzekaźnikiem i ekspresją katecholamin, ale bez możliwości ich magazynowania (64). Tak kodowane neurony mogą odgrywać znaczącą rolę w procesach patofizjologicznych (64). Oprócz podstawowych neuroprzekaźników w neuronach serca znajduje się szereg innych substancji biologicznie aktywnych, które występują w różnych kombinacjach i odgrywają istotną rolę w neuromodulacji i transmisji zwojowej, dlatego też neurony zwojów serca są trudne do zdefiniowania pod względem funkcjonalnym i fenotypowym (64). Informacje te pozwalają zrozumieć sposób kodowania neuronów w sercu 10-tygodniowego płodu świni, gdzie zachwiane proporcje między głównymi neuroprzekaźnikami w neuronach mogą wskazywać na niedokończone jeszcze procesy migracji, różnicowania i definiowania

neuroprzekaźnika. Kolejną obserwacją dotyczącą płodów jest obecność wielu włókien nerwowych, zwłaszcza w nasierdziu i zawierających D β H, które najprawdopodobniej są aksonami perykarionów zwojów pnia współczulnego. Włókna nerwowe VACHT-pozytywne są widoczne w nasierdziu, a pojedyncze w mięśniówce serca i wsierdziu. Nerwy te prawdopodobnie pochodzą ze zwojów serca i znajdują się na etapie penetracji i wydłużania.

Ciekawą obserwacją okazała się obecność CGRP-pozytywnych perykarionów w zwojach serca płodu. Generalnie występowanie tego neuropeptydu wiązane jest z włóknami czuciowymi, jednak niektórzy autorzy nie wykluczają jego obecności w aksonach komórek nerwowych zwojów serca (17, 120) również u świni (17). Neurony CGRP-pozytywne znajdują się w sercu świnek morskich, ale także CGRP zawarty jest w komórkach SIF. Włókna nerwowe CGRP-pozytywne stanowią liczną podpopulację w sercu prosiąt (17). Włókna cholinergiczne zawierające CGRP prawdopodobnie biorą udział w rozszerzaniu naczyń wieńcowych (17, 64) i mogą również odgrywać rolę w neutralnym ujemnym wpływie inotropowym na czynność mięśnia sercowego obserwowanym podczas cholinergicznego skurczu naczyń wieńcowych u świń (13, 17). Wiadomo, że inną grupą włókien nerwowych CGRP-pozytywnych są włókna o charakterze czuciowym, będące wypustkami perykarionów zwojów rdzeniowych lub nerwu błędnego (17, 25). U dziesięcioletniowych płodów neurony CGRP-pozytywne widoczne są głównie w dużych zwojach serca (13,55%), natomiast włókna nerwowe były miernie reprezentowane na całym obszarze serca. W sercu ludzkich płodów obecność włókien nerwowych CGRP/SP-pozytywnych (czuciowych) nie została wykryta do 24 tygodnia ciąży (31). Wiadomo, że unerwienie czuciowe pojawia się później niż unerwienie autonomiczne (16, 17, 31), co również potwierdzają badania na sercu 10-tygodniowych płodów.

Podsumowując, w niniejszym zadaniu, uzyskane wyniki po raz pierwszy dokumentują struktury nerwowe serca i chemiczne kodowanie u 10-tygodniowych płodów świni. Konfiguracja tych struktur nerwowych przedstawia stosunkowo wysoki stopień zaawansowania, różni się jednak od tego, który obserwuje się w sercach kilkutygodniowych osobników (6, 16, 17). Kodowanie neurochemiczne struktur nerwowych serca na tym etapie rozwoju jest także nieco inne niż w sercach kilkutygodniowych świń (17), a obecność CGRP-pozytywnych perykarionów może świadczyć o intensywnych zmianach zachodzących w zwojach sercowych w tym okresie. Należy nadmienić, że CGRP może pełnić funkcje naprawcze w obwodowym układzie nerwowym świni, bowiem jego ekspresja wzrasta

w neuronach z zapoczątkowanym procesem apoptozy (48). Uważa się również, że w sercu człowieka i szczura pełni funkcję kardioprotekcyjną (120), np. po jego przeszczepie. Nie wyklucza się także jego udziału w przebiegu intensywnych zmian zachodzących w strukturach nerwowych w trakcie rozwoju. Obserwacja ta wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań dotyczących serca płodów świń, bowiem osobniki tego gatunku brane są pod uwagę jako potencjalni dawcy tego narządu dla chorych ludzi.

4.3.4. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiły po raz pierwszy dokonanie opisu niektórych aspektów rozwoju unerwienia żeńskich narządów rozrodczych oraz zwoju przyszyjkowego w trzech okresach życia płodowego, jak również przeanalizowanie stanu unerwienia serca w dziesiątym tygodniu życia płodowego u świni.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. U świni między piątym a dziesiątym tygodniem rozwoju prenatalnego następuje intensywny rozwój autonomicznego układu nerwowego. Zmiany dotyczą organizacji przestrzennej zwojów splotu miednicznego, w tym PCG, liczby neuronów i ich kodowania, jak również projekcji włókien nerwowych do rozwijającego się układu rozrodczego.
2. Wraz ze zmniejszającą się średnicą przewodów śródnerczowych i zwiększającą średnicą przewodów przyśródnerczowych, rośnie liczba włókien nerwowych w mezenchymie. Potwierdza to przypuszczenie o zależności wspomnianych procesów od siebie i ich wpływie na histologiczną przebudowę struktur, z których kształtuje się ostateczny układ rozrodczy żeński.
3. W piątym tygodniu rozwoju prenatalnego świni struktury nerwowe reprezentowane są przez neurony migrujące do jamy ciała, widoczne również przy śródnercach i przewodach śródnerczowych. Neurony D β H-pozytywne są liczniejsze niż VAcHT-pozytywne. Pojedyncze włókna nerwowe, rozmieszczone wzdłuż grzebieni płciowych, zawierają D β H lub VAcHT. Pojedyncze, krótkie włókna nerwowe, układające się równolegle do przewodów śródnerczowych, zawierają D β H.
4. W siódmym tygodniu rozwoju prenatalnego świni układ rozrodczy żeński przedstawia się w postaci niezróżnicowanych gonad, przewodów przyśródnerczowych, w których możemy wyszczególnić odcinki: jajowodowy, maciczny, maciczno-pochwowy.

Na wysokości kanału maciczno-pochwowego zauważalna jest zwarta struktura nerwowa, będąca kształtującym się zwojem przyszyjkowym, sięga ona również do końców odcinków macicznych przewodów przyśródnerczowych. Włókna nerwowe układają się wzdłuż mezenchymy, a pojedyncze wnikają na jej teren. Przy krawędzi mezenchymy, głównie po stronie brzuszno-bocznej, widoczne są małe skupiska neuronów (od 3-4 do 20 neuronów). Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność D β H lub VAcHt w neuronach PCG. Zaobserwowano również obecność pojedynczych perykarionów D β H/VAcHt- i D β H-pozytywnych o słabej immunoreaktywności, co może świadczyć o zmieniającym się fenotypie neuronów.

5. W dziesiątym tygodniu rozwoju prenatalnego widoczne są jajniki, nerki, a śródnercza występują w formie szczątkowej. Obserwowany jest dalszy zrost odcinków macicznych w kanał maciczno-pochwowy. PCG jest mniej jednolitą strukturą, bardziej rozciągniętą i rozbudowaną wzdłuż kanału maciczno-pochwowego, nadal sięgającą do odcinków macicznych przewodów przyśródnerczowych. W tym okresie włókna nerwowe intensywnie wnikają na teren mezenchymy, szczególnie na wysokości kanału maciczno-pochwowego, macicznego i w mniejszym stopniu jajowodowego. Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność VAcHt-, D β H- i D β H/VAcHt-pozytywnych perykarionów na terenie PCG.
6. W rozwijającym się jajniku nie zaobserwowano włókien nerwowych w żadnym z badanych okresów.
7. Między siódmym a dziesiątym tygodniem rozwoju ulega zmianie liczba neuronów w PCG z około 3144 do 4121. Średnica perykarionów również ulega zmianie z 7-9 μ m w pierwszym, do 8-10 μ m w drugim i 11-15 μ m w trzecim badanym okresie. Obserwacje te sugerują, że rozwój zwojów splotu miednicznego przebiega intensywnie i obejmuje równoległe przebiegające procesy migracji, różnicowania się neuronów i prawdopodobnie apoptozy niektórych komórek nerwowych.
8. Między siódmym a dziesiątym tygodniem rozwoju płodowego zaznacza się już charakterystyczny wzorzec rozmieszczenia neuronów w PCG, w którym można wyróżnić obszar występowania neuronów adrenergicznych (przednia część zwoju) i cholinergicznym (tylna część zwoju). W siódmym tygodniu rozwoju neurony D β H-pozytywne zlokalizowane są w całym obszarze zwoju, natomiast VAcHt-pozytywne, z niewielką przewagą, w jego tylnej części. W dziesiątym tygodniu rozwoju podział na wspomniane „obszary” jest silniej zaznaczony, co świadczy o intensywnym

- rozwoju PCG oraz innych autonomicznych struktur nerwowych, z których wywodzą się włókna przedzwojowe dochodzące do badanego zwoju.
9. Różnica w procentowym udziale podpopulacji neuronalnych zawierających markery głównych neurotransmiterów w PCG pomiędzy 7- a 10-tygodniowymi płodami jest bardzo wyraźna (płody 7-tygodniowe - 36,40% DβH- i 17,31% VAcHT-pozytywnych neuronów; płody 10-tygodniowe – 40,26% DβH- i 30,73% VAcHT-pozytywnych neuronów). Obserwacje te mogą wskazywać na obecność neuronów neurochemicznie nieokreślonych oraz na postępującą zmianę fenotypu zważywszy na fakt, że u niedojrzałej płciowo świni występuje mniejszy odsetek neuronów adrenergicznych (23%) i zdecydowanie większy cholinergicznych (77%).
 10. W dziesiątym tygodniu rozwoju prenatalnego w neuronach oprócz klasycznych neuroprzekaźników pojawiają się również inne substancje biologicznie aktywne, tj. NPY, SOM i VIP.
 11. Obecność neuronów DβH/VIP-, DβH/SOM- lub tylko SOM-pozytywnych w PCG 10-tygodniowego płodu również wskazuje na trwający proces definiowania neuronalnego fenotypu, ponieważ tak kodowane neurony nie są spotykane w PCG młodej świni.
 12. W mezenchymie, na wysokości kanału maciczno-pochwowego przewodu przyśródnerczowego, obserwowana jest niewielka liczba włókien DβH/NPY- oraz bardzo dużo VAcHT/VIP-pozytywnych. Przypuszczalnie są to aksony perykarionów PCG już określonych neurochemicznie, które osiągnęły narząd docelowy i pojawienie się ich może oznaczać zapoczątkowanie kolejnej fazy w rozwoju narządów żeńskiego układu rozrodczego.
 13. W PCG i rozwijającym się żeńskim układzie rozrodczym płodów świni nie stwierdzono obecności GAL i NOS w strukturach nerwowych w badanych okresach rozwojowych. Wskazuje to, że u świni wspomniane neuropeptydy pojawiają się później, może dopiero w okresie okołoporodowym, jak u innych gatunków.
 14. W żadnym z badanych trzech okresów rozwoju płodowego nie stwierdzono obecności CGRP i SP w strukturach nerwowych. Obserwacja ta potwierdza pogląd, że układ autonomiczny rozwija się wcześniej niż czuciowy.
 15. W sercu 10-tygodniowego płodu świni znajdują się typowe struktury nerwowe dla tego narządu.

16. Na tym etapie rozwoju proces migracji i proliferacji neuronów nie jest jeszcze zakończony. Zwoje zatokowo-przedsionkowy i przedsionkowo-komorowy serca płodu zawierają mniejszą liczbę perykarionów (odpowiednio 262 ± 12 i 236 ± 13) niż te zwoje w sercu kilkutygodniowych prosiąt (średnio 359 ± 178 w dużych zwojach).
17. Zdecydowanie mniej małych skupisk neuronów występuje na terenie całego serca płodu (117 ± 21) w porównaniu z sercem młodej świni (361 ± 52).
18. Neurony zwojów sercowych zawierają VAcHT, D β H lub CGRP. Pojedyncze komórki nerwowe są VAcHT/D β H-pozytywne. Perykariony zawierające VAcHT są najliczniej reprezentowaną populacją komórek. Obserwacje te sugerują, że kodowanie chemiczne neuronów serca w dziesiątym tygodniu rozwoju płodowego świni jest w trakcie definiowania i przypuszczalnie reorganizacji.

4.3.5. Literatura

- [1] An M, Luo R, Henion PD (2002) Differentiation and maturation of zebrafish dorsal root and sympathetic ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 466:267-275
- [2] Anderson R, Stewart A, Young H (2006) Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res.* 323:11-25
- [3] Apostolova G, Dechant G (2009) development of neurotransmitter phenotypes in sympathetic neurons. *Auton. Neurosci.* 151:30-38
- [4] Arrighi S, Bosi G, Cremonesi F, Domeneghini C (2008) Immunohistochemical study of the pre- and postnatal innervation of the dog lower urinary tract: morphological aspects at the basis of the consolidation of the micturition reflex. *Vet. Res. Communic.* 32:291-304
- [5] Ashwal S (1999) Neonatal and infantile development of the autonomic nervous system: Functional and clinical implications. Vinken PJ, Bruyn GW *the autonomic nervous system*. Red. O. Appenzeller. Elsevier, Amsterdam-New York-Tokyo
- [6] Batulevicius D, Skripka V, Pauziene N, Pauza DH (2008) Topography of the porcine epicardiac nerve plexus as revealed by histochemistry for acetylcholinesterase. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 138:64-75
- [7] Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundström E, García-Castro MI (2010) Analysis of early human neural crest development. *Dev. Biol.* 344:578-592
- [8] Bockman DE, Redmond ME, Kirby MI (1989) Alteration of early vascular development after ablation of cranial neural crest. *Anat. Rec.* 225:209-217
- [9] Botti M, Ragionieri L, Gazza F, Acone F, Minelli L, Panu R (2009) Striated perineal muscles: location of autonomic, sensory, and somatic neurons projecting to the male pig bulbospongiosus muscle. *Anat Rec (Hoboken)* 292:1756-63
- [10] Brandl C, Florian C, Driemel O, Weber BH, Morscheck C (2009) Identification of neural crest-derived stem cell-like cells from the corneal limbus of juvenile mice. *Exp. Eye Res.* 89:209-217
- [11] Bronner ME, LeDouarin M (2012) Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol.* 366:2-9
- [12] Calloni GW, Le Douarian NM, Dupin E (2009) High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic and osteogenic differentiation capacities. *Proc Natl Acad Sci. USA* 106:8947-8952

- [13] Cinca J, Carreno A, Moni L, Blanch P, Soler-Soler J (1996) Neurally-mediated negative inotropic effect impairs myocardial function during cholinergic coronary vasoconstriction in pig. *Circulation* 94:1101-1108
- [14] Conway SJ, Henderson DJ, Kirby ML, Anderson RH, Copp AJ (1997) Development of a lethal congenital heart defect in the splotch (Pax3) mutant mouse. *Cardiovasc. Res.* 36:163-173
- [15] Crick SJ, Seppard MN, Anderson RH (2000) The nervous system and the heart. Ter Horst GT, editor. Totowa NJ: Humana Press
- [16] Crick SJ, Anderson RH, Yen Ho S, Sheppard MN. (1999a) Localization and quantitation of autonomic innervation of the porcine heart II: endocardium, myocardium and pericardium. *J Anat* 195 (1999b) 359-373
- [17] Crick SJ, Sheppard MN, Yen Ho S, Anderson RH (1999b) Localization and quantitation of autonomic innervation of the porcine heart I: conduction system. *J. Anat.* 195:341-357
- [18] Czaja K, Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Łakomy M (2001b) Distribution of efferent neurones innervating the oviduct in the pig. *Folia morphologica* 60, 243–8.
- [19] Czaja K, Wasowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Łakomy M (2001a). Distribution and immunohistochemical characterisation of paracervical neurons innervating the oviduct in the pig. *Folia morphologica*, 60, 205–11.
- [20] Dail WG, Palmer GC (1973) Localisation and correlation of catecholamine-containing cells with adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities in the human fetal heart. *Anatomical record* 177:265-288.
- [21] Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, Le Douarin NM (2000) Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glial through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 97:7882-7887
- [22] Enomoto H, Heuckeroth RO, Golden JP, Johnson EM, Milbrandt J (2000) Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential action of GDNF and neurturin. *Development* 127:4877-4889
- [23] Ernsberger U (2009) Role of neurotrophin signaling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res.* 336:349-384
- [24] Evans HE, Sack WO (1973) Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat. Histol. Embryol.* 2:11-45.
- [25] Forsgren S (1994) Distribution of calcitonin gene-related immunoreactivity in the bovine conduction system: correlation with substance. *Regulatory Peptides* 52:7-19
- [26] Francis N, Landis S (1999) Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:541–566
- [27] Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T. (2005) Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:4200-4208
- [28] Garcia-Castro MI, Marcelle C, Bronner-Fraser M (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297:848-851.
- [29] Georgas KM, Armstrong KM, Keast J, Larkins CE, McHugh KM, Southard-Smith EM, Cohn MJ, Batourina E, Dan H, Schneider K, et al. (2015) An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. *Development* 142:1893–1908.
- [30] Glavic A, Maris HS, Gloria FC, Bastidas F, Allende ML, Mayor R (2004) Role of BMP signaling and the homeoprotein Iroquois in the specification of the cranial placodal field. *Dev Biol* 272:89-103
- [31] Gordon L, Polak JM, Moscoso GJ, Smith A, Kuhn DM, Warton J (1993) Development of the peptidergic innervation of human heart. *J. Anat.* 183:131-140
- [32] Guioli S, Sekido R, Lovell-Badge R (2007) The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Dev. Biol.* 302:389-98
- [33] Hair L, Brault V, Kleber M, Lee HY, Ille F, Leimeroth R, Paratore C, Suter U, Kemler R, Sommer L (2002) Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. *J. Cell Biol.* 159:867-880

- [34] Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49-92
- [35] Hasan W (2013) Autonomic cardiac innervation. *Organogenesis* 9:176-193
- [36] Hashimoto R (2003) Development of the human Müllerian duct in the sexually undifferentiated stage. *Anatomical Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 272:514-9.
- [37] Hashino E, Shero M, Junghans D, Rohrer H, Milbrandt J, Johnson Jr EM (2001) GDNF and neurturin are target-derived factors essential for cranial parasympathetic neuron development. *Development* 128:3773-3782
- [38] Hildreth V, Weeb S, Bradshaw I, Brown NA, Anderson RH, Henderson DJ (2008) Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart. *J. Anat.* 212:1-11
- [39] Hiltunen JO, Laurikainen A, Airaksinen MS, Saarma M (2000) GDNF family receptors in the embryonic and postnatal rat heart and reduced cholinergic innervation in mice hearts lacking ret or GFRalpha2. *Dev Dyn.* 219:28-39
- [40] His W. (1868) Untersuchungen über die Erste Anlage des Wirbelthierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei, Leipzig.
- [41] Honman Y, Araki T, Gianino S, Bruce A, Heuckeroth R, Johnson E, Milbrandt J (2002) Artemin is a vascular-derived neurotrophic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35:267-282
- [42] Howard M (2005) Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons. *Dev. Biol.* 277:271–286
- [43] Huang ME, Nguyen V, Wu Y, Rastogi S, Lui CY, Birnbaum Y, Wang HQ, Ware DL, Chauhan M, Garg N, i in. (2009) Reducing ischaemia/reperfusion injury through delta-opioid-regulated intrinsic cardiac adrenergic cells: adreno-peptidergic co-signalling. *Cardiovasc. Res.* 3:452-60
- [44] Itäranta P, KeijoViiria K, Kaartinenb V, Vainio S (2009) Lumbo-sacral neural crest derivatives fate mapped with the aid of Wnt-1 promoter integrate but are not essential to kidney development. *Diferentiation* 77:199-208
- [45] Jen PYP, Dixon JS (1995) Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. *J. Anat.* 187:169-179
- [46] Jordan SM (1970) Adrenergic and cholnergic innervation of the reproductive tract and ovary in the guinea-pig and rabbit. *J Physiol* 210:115–117.
- [47] Kaleczyc J, Kasica-Jarosz N, Pidsudko Z, Dudek A, Klimczuk M, Sienkiewicz W (2020) Effect of castration on pelvic neurons in the male pig. *Histochem. Cell Biol.* 2020 153:135-151
- [48] Kaleczyc J, Lepiarczyk E (2021) The effect of castration on peripheral autonomic neurons supplying mammalian male genitourinary system. *Int. J. Mol. Sci.* 22,7632: 10.3390/ijms22147632
- [49] Kaleczyc J, Wąsowicz K, Klimczuk M, Czaja K, Łakomy M (2003) Immunohistochemical characterisation of cholinergic neurons in the anterior pelvic ganglion of the male pig. *Folia Histochem. Cytobiol.* 41:65-72
- [50] Kanerval L (1972) Ultrastructure of sympathetic ganglion cells and granule-containing cells in the paracervical (Frankenhäuser) ganglion of the newborn rat. *Z Zellforsch Mikrosk. Anat.* 126:25-40
- [51] Kanerva JL, Hervonen A, Hervonen H (1994) Morphological characteristics of the ontogenesis of the mammalian peripheral adrenergic nervous system with special remarks on the human fetus. *Medical Biology* 52:144-153
- [52] Kasemeier-Kulesa JC, Bradley R, Pasquale EB, Lefcort F, Kulesa PM (2006) Eph/ephrins and N-cadherin coordinate to control the pattern of sympathetic ganglia. *Development* 133:4839-4847
- [53] Kasemeier-Kulesa JC, Kulesa PM, Lefcort F (2005) Imagin neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Development* 132:235-245
- [54] Kawashima T (2005) The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course and peripheral distribution. *Anat Embryol.* 209:425-438

- [55] Keast J (1995) Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* 66:655-662
- [56] Keast J. (1999) Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Internat. review of cytology* 193, 1-69
- [57] Keast JR, Smith-Anttila CJA, Osborne PB (2015) Developing a functional urinary bladder: a neuronal context. *Front. Cell and Dev. Biol.* 3:53
- [58] King P, Redden D, Palmgren JS, Naborsa LB, Lennond V (1999) Hu antigen specificities of ANNA-I autoantibodies paraneoplastic neurological disease. *J. Autoimmun.* 13:435-443
- [59] Kirby MI (1988) Nodose placode contributes autonomic neurons to the heart in the absence of cardiac neural crest. *J. Neurosci* 8:1089-1095
- [60] Kirby ML, Stewart DE (1983) Neural crest origin of cardiac ganglion cells in the chick embryo: Identification and extirpation. *Dev. Biol.* 97:433-443
- [61] Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson Jr EM, Milbrandt J (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384:467-470
- [62] Krull CE (2001) Segmental organization of neural crest migration. *Mech. Dev.* 105:37-45
- [63] Kuder T (2002) Autonomiczny układ nerwowy. Wydawnictwo Akademii Świętokrzyskiej, im. Jana Kochanowskiego, Kielce 2002, ISBN 83-7133-168-1
- [64] Kuder T, Nowak E (2015) Autonomic cardiac nerves: literature review. *Folia Morphol.* 74:1-8
- [65] Kulesa PM, Lefcort F, Kasemeier-Kulesa JC (2009) The migration of autonomic precursor cells in the embryo. *Aut. Neurosci.* 151:3-9
- [66] Kuratani SC, Kirby MI (1991) Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. *Am. J. Anat* 191:215-227
- [67] Kurita T (2010) Developmental origin of vaginal epithelium. *Differentiation* 80:99-105
- [68] Kurita T (2011) Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation* 82: 117-26
- [69] Kuruwilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, Ginty DD (2004) A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118:243-255
- [70] Lahteenmaki M, Kupari J, Airaksinen MS (2007) Increase apoptosis of parasympathetic but not enteric neurons in mice lacking GFRalpha2. *Dev. Biol.* 305:325-332
- [71] LeDourian NM, Kalcheim C (1999) The neural crest. Cambridge University Press, Cambridge, p.445
- [72] Lee HY, Kleber M, Hair L, Brault V, Suter U, Taketo MM, Kemler R, Sommer L (2004) Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science* 303:1020-1023
- [73] Li HY, Say EH, Zhou XF (2007) Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25:2053-2065
- [74] Luther J, Birren S (2009) Neurotrophins and target interactions in the development and regulation of sympathetic neuron electrical and synaptic properties. *Auton. Neurosci.* 151:46-60.
- [75] Majewski M (1997) Afferentne i efferentne unerwienie jajnika świni - źródła pochodzenia i kodowanie chemiczne. Praca habilitacyjna. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst.* 545 *Veterinaria* 24, Suppl. B
- [76] Makita T, Suciv HM, Garipey CE, Yanagisawa M, Ginty DD (2008) Endothelins are vascular-derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons. *Nature* 452:759-763
- [77] Marshall AM (1879) The morphology of the vertebrate olfactory organ. *Quarterly Journal of Microscopic Science.* 19:300-340.

- [78] Meusburger S, Keast J (2001) Testosterone and nerve growth factor have distinct but interacting effects on structure and neurotransmitter expression of adult pelvic ganglion cells in vitro. *Neuroscience* 108:331–340
- [79] Mitchell B (1993) Morphology and neurochemistry of the pelvic, and paracervical ganglia. *Histol. Histopathol.* 8:761-773
- [80] Mitchell B, Ahmed E (1992) An immunohistochemical study of the catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in the female guinea-pig uterus and vagina. *Histochem. J.* 24:361-367
- [81] Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H et al. (2008) Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2:329-403
- [82] Nyangoh KT, Bessede T, Lebacle C, Zaitouna M, Martinovic J, Diallo D, Creze M, Chevallier JM, Darai E, Benoît G, Moszkowicz D (2016) Levator ani muscle innervation: Anatomical study in human fetus. *Urol. Neurodynamic* 36:1464-1471
- [83] Olfat S, Rahman S (1978) Pre-natal innervation of the human female genital tract. *Acta Anatomica* 101:359–71.
- [84] O’Rahilly R, Müller F (2007) The development of the neural crest in the human. *J. Anat.* 211, 335-351
- [85] Papka R., Cotton J, Traurig H (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res.* 242:475-490
- [86] Papka R, Traurig H, Klenn P (1987) Paracervical ganglia of the female rat: Histochemistry and immunohistochemistry of neurons, SIF cells, and nerve terminals *Developmental dynamics* 179:243-257
- [87] Pappano AJ (1977) Ontogenetic development of autonomic neuroeffector transmission and transmitter reactivity in embryonic and fetal hearts. *Pharmacol. Review* 29:3-33
- [88] Partanen JS, Korkala O (2007) Catecholamines in human fetal heart. *Experientia* 30:798-800
- [89] Patten BM (1948) *Embryology of the pig* third edit., Home Farm Books Publication.
- [90] Patthey C, Gunhaga L, Edlund T (2008) Early development of the central and peripheral nervous system is coordinated by Wnt and BMP signals. *PLoS one* 3:1625
- [91] Pauli S, Steckel M, Zoll B, Wehner LE (2007) CHARGE - Von einer assoziatio zum syndrom. *Monatsschrift für Kinderheilkunde.* 155:23–28
- [92] Pidsudko Z, Listowska Ż, Franke-Radowiecka A, Klimczuk M, Zalecki M, Kaleczyc J (2019) Distribution and chemical coding of urinary bladder apex-projecting neurons in aorticorenal and testicular ganglia of the male pig. *Pol. J. Vet. Sci.* 22:427-430
- [93] Podlasz P, Wasowicz K (2008) Neurochemical characteristics of paracervical ganglion in the pig. *Veterinarni Medicina* 53:135–146
- [94] Prozorowska E, Jackowiak H, Skiersz-Szewczyk K (2018) Morphology and topography of internal reproductive organs in the female cat during prenatal and postnatal development: Scanning electron microscope and three-dimensional reconstruction study. *J. Morph.* 279:1764–1775.
- [95] Ptak K, Lewandowski M, Monteau R (2000) Ekspresja genów HOX w trakcie różnicowania i rozwoju pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego. *Kosmos* 49:97-104
- [96] Raible DW, Wood A, Hodson W, Henion PD, Weston JA, Eisen JS (1992) Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* 195:29-42
- [97] Ragonieri L, Botti M, Gazza F, Sorteni C, Chiochetti R, Clavanzani P, Bo Minelli L, Panu R (2013) Localization of peripheral autonomic neurons innervating the boar urinary bladder trigone and neurochemical features of the sympathetic component. *Eur. J. Histochem.* 57:93-105
- [98] Reimann W, Schneider F (1993) Galanin receptor activation attenuates norepinephrine release from rat spinal cord slices. *Life Sci.* 52:251-254

-
- [99] Rothman TP, Nilaver G, Gershon MD (1984) Colonization of the developing murine enteric nervous system and subsequent phenotypic expression by the precursors of peptidergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 255:13–2
- [100] Samiec M, Skrzyszowska M (2011) The possibilities of practical application of transgenic mammalian species generated by somatic cell cloning in pharmacology, veterinary medicine and xenotransplantation. *Polish J. Vet. Sci.* 2:329-340
- [101] Santiago A, Erickson CA (2002) Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129:3621-3632
- [102] Sato M, Yost HJ (2003) Cardiac neural crest contributes to cardiomyogenesis in zebrafish. *Dev. Biol.* 257:127-139
- [103] Sarkozy A, Digilio MK, Dallapiccola B (2008) Leopard Syndrome. *Orphanet. J. Rare Diseases* 3:1-8
- [104] Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M, (2008) A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:557-568
- [105] Schneider C, Wicht H, Enderich J, Wegner M, Rohrer H (1999) Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* 24:861-870
- [106] Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE (1989) A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 106:809-816
- [107] Shakhova O, Sommer L (2008) Neural crest-derived stem cells. *StemBook* Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; ISSN: 1940-342
- [108] Shaw G, Renfree MB (2014) Wolffian duct development. *Sex Dev* 8, 273-80
- [109] Shoba T, Tay SS (2000) Nitroergic and peptidergic innervation in the developing rat heart. *Anat. Embryol.* 201:491-500
- [110] Shwarz Q, Maden CH, Viera JM, Ruhrberg C (2009) Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:6164-6169
- [111] Stahnke N (2004) Ullrich-Turner-Syndrom und Noonan-Syndrom. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 152, 517–527
- [112] Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71:973-985
- [113] Steventon B, Carmona-Fontaine C, Mayor R (2005) Genetic network during neural crest induction. From cell specification to cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:647-654
- [114] Stokes PJ, Abeydeera LR, Leese HJ (2005) Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo “cross talk” in vitro. *Dev. Biol.* 284:62-71
- [115] Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb Jr FJ, Frazier KS (2012) Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing *Vet Pathol* 49, 344-356
- [116] Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu K, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S (2005) Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* 170:1135-1146
- [117] Vaglia J, Hall BK (1999) Regulation of neural crest cell populations: occurrence, distribution and underlying mechanisms. *Int. J. Dev. Biol.* 43:95-110
- [118] Van Gineken C, Van Meir F, Sommereyns G, Sys S, Weyns A (1998) Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. *Anat. Embryol.* 198:399-408
- [119] Van Orden DE, Farley DB (1983) Effect of parasympathetic decentralization and paracervical ganglion excision on reproductive function in the rat. *Biol. Reprod.* 28:910-916

- [120] Végh AMD, Duim SN, Smits AM, Poelmann RE, Ten Harkel ADJ, DeRuiter MC, Goumans MJ, Jongbloed MRM (2016) Part and Parcel of the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3,28: 10.3390/jcdd3030028
- [121] Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J (2005) The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad. Sci.* 1049:161-171.
- [122] Waldo K, Zdanowicz M, Burch J, Kumiski DH, Stadt HA, Godt RE, Creazzo TL, Kirby ML (1999) A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J. Clin. Invest.* 103:1499-1507
- [123] Wang X, Chan, A, Sham M, Burns A, Chan W (2011) Analysis of the Sacral Neural Crest Cell Contribution to the Hindgut Enteric Nervous System in the Mouse Embryo. *Gastroenterology* 141:992-1002
- [124] Wanigasekara Y, Kepper M, Keast J (2003) Immunohistochemical characterisation of pelvic autonomic ganglia in male mice. *Cell Tissue Res.* 311:175-185
- [125] Wąsowicz K, Majewski M, Łakomy M (1998) Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 74:13-22
- [126] Wąsowicz K, Podlasz P, Czaja K, Łakomy M (2002) Uterus-innervating neurones of paracervical ganglion in the pig: immunohistochemical characteristics. *Folia Morphol* 61, 15–20
- [127] Wiater J (2018) Czy dzięki metodom inżynierii genetycznej ksenotransplantacja stanie się faktem? Transgeniczne świny jako potencjalni dawcy narządów dla człowieka. *Kosmos* 320:541-553
- [128] Wiese C, Deal K, Ireland S, Cantrell V, Southard-Smith E (2017) Migration pathways of sacral neural crest during development of lower urogenital tract innervation. *Develop. Biol.* 429, 356-369
- [129] Wiese C, Ireland S, Fleming N, Yu J, Valerius M, Georgas K, Chiu H, Brennan J, Armstrong J, Little M, McMahon A, Southard-Smith E (2012) A genome-wide screen to identify transcription factor expressed in pelvic ganglia of the lower urinary tract. *Front. Neurosci.* 6:130
- [130] Wright LL, Smolen AJ (1987) The role of neuron death in the development of the gender difference in the number of neurons in the rat superior cervicale ganglion. *Int. J. Devl. Neurosci.* 5:305-311
- [131] Yan H, Newgreen DF, Young HM (2003) Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and sympathetic ganglia to GDNF, neurturin and artemin. *Dev. Dyn.* 227:395-401
- [132] Young HM, Anderson RB, Anderson CR (2004) Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Auton. Neurosci.* 112:1-14
- [133] Young HM, Cane KN, Anderson CR (2011) Development of the autonomic nervous system: A comparative view. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 165:10-27
- [134] Yan H, Keast JR (2008) Neurturin regulates postnatal differentiation of parasympathetic pelvic ganglion neurons initial axonal projections, and maintenance of terminal fields in male urogenital organs. *J. Comp. Neurol.* 507:1169-1183
- [135] Zang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defect in mice lacking transcription factors AP-2. *Nature* 381:238-241
- [136] Zvarova K, Vizzard MA (2005) Distribution and fate of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CARTp)-expressing cells in rat urinary bladder: a developmental study. *J. Comp. Neurol.* 489:501-517

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W celu nawiązania współpracy z innymi ośrodkami naukowymi i podniesienia swoich kwalifikacji odbyłam następujące staże zagraniczne:

Belgia 01.04-30.06.1999, staż naukowo-dydaktyczny, Laboratory of Cell Biology and Histology, University of Antwerp (RUCA), Prof. Dietrich W. Scheuermann, Prof. dr Jean-Pierre Timmermans

W trakcie trwania stażu rozszerzyłam i udoskonaliłam swój warsztat z zakresu technik immunohistochemicznych. Zajmowałam się badaniami dotyczącymi źródeł unerwienia gruczołu sutkowego świni, a uzyskane wyniki stały się częścią mojej pracy doktorskiej. Ponadto, przeprowadziłam wstępne obserwacje obejmujące dystrybucję i immunohistochemiczną charakterystykę neuronów kompleksu zwoju trzewno-krezkowego (CSMG) i zwoju krezkowego tylnego (IMG), zaopatrujących jelito biodrowe u świni. Podczas stażu uczestniczyłam również w wykładach i ćwiczeniach praktycznych z zakresu anatomii i histologii.

Belgia 06.09-06.12.2000, staż naukowo-badawczy, Laboratory of Cell Biology and Histology, University of Antwerp (RUCA), Prof. dr Jean-Pierre Timmermans

W trakcie trwania stażu kontynuowałam badania dotyczące dystrybucji i immunohistochemicznej charakterystyki neuronów kompleksu zwoju trzewno-krezkowego (CSMG) i zwoju krezkowego tylnego (IMG), zaopatrujących jelito biodrowe u świni. W czasie stażu miałam możliwość pogłębienia umiejętności posługiwania się techniką mikroskopii konfokalnej oraz zapoznania się z najnowszymi mikroskopowymi technikami obrazowania. Podczas mojego pobytu w *Laboratory of Cell Biology and Histology* miałam także możliwość nawiązania kontaktów z innymi naukowcami i za pozwoleniem Pana Profesora Jean-Pierre'a Timmermansa przeprowadzenia wspólnych badań.

Efektom dokonań badawczych była możliwość zaprezentowania uzyskanych wyników na międzynarodowych konferencjach naukowych, jak również przedstawienia ich w publikacji:

Franke-Radowiecka A, Majewski M, Kaleczyc J, Klimczuk M, Łakomy M, Scheuermann DW and Timmermans JP (2001) *Distribution and neurochemical coding of PACAP-immunoreactive (PACAP-IR) neurons involved in the neural circuits controlling the ileum and celiac-superior mesenteric ganglion complex (CSMG) in the pig.* Anatomische Gesellschaft-96. Versammlung, Münster, 23-26.III.2001

Pidsudko Z, Kaleczyc J, Czaja K, Sienkiewicz W, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Timmermans JP, Łakomy M (2002) *The distribution and chemical coding of nerve fibres and neurons in the coeliac/superior mesenteric ganglion complex (CSMG) projecting to the ileum and nerve fibres in the*

ileum wall after chemically induced inflammation. Annals of Anatomy, 185: 302-303. 12thAnnual Meeting of the European Neuropeptide Club-ENC, Olsztyn, 22-25 May 2002

Costagliola A, Majewski M, Franke-Radowiecka A, Cecio A, Timmermans JP (2001) *PACAP and its co-markers in the neural structures controlling the chicken oviduct. Anatomische Gesellschaft-96. Versammlung, Münster, 23-26.III.2001*

Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M, Timmermans JP (2004) *The distribution and chemical coding of neurons in the celiac-superior mesenteric ganglion complex supplying the normal and inflamed ileum in the pig. Polish Journal of Veterinary Sciences 7:199-101 (IF 0; punktacja MNiSW: 6)*

USA 11.04-01.05.2012, staż dydaktyczny – “Wzmocnienie potencjału dydaktycznego ProEDU”, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology, Washington State University, Pulman, Prof. Steve M. Simasko, Ph.D

W trakcie trwania stażu zapoznałam się z programem kształcenia, zagadnieniami oraz sposobem realizacji ćwiczeń i wykładów z Anatomii Zwierząt. Byłam obserwatorem ćwiczeń i wykładów. Zapoznałam się z organizacją pracy prosektorium, sposobami przygotowywania, utrwalania i przechowywania preparatów. Brałam czynny udział w procesie egzaminacyjnym. Pobyt w Pulman pozwolił na wzbogacenie mojego warsztatu dydaktycznego, co w rezultacie zaowocowało udoskonaleniem procesu nauczania w Katedrze Anatomii Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna

- Zajęcia ze studentami I i II roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej - Anatomia Zwierząt (od 1995 do 2005).
- Zajęcia ze studentami I roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej - Anatomia Zwierząt (od 2005 do chwili obecnej).
- Zajęcia ze studentami II roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej - Anatomia Topograficzna (1998-2003).
- Zajęcia ze studentami I roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej - Biologia Molekularna (1999-2001).

- Zajęcia ze studentami I roku Wydziału Bioinżynierii Zwierząt - Anatomia Zwierząt (od 2006 do chwili obecnej).
- Od 1 października 2004 do 30 czerwca 2010 pełniłam funkcję Zastępcy Opiekuna Roku, przyznaną przez Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.

6.2. Opieka naukowa nad pracami inżynierskimi

- Byłam Promotorem dwóch prac inżynierskich z Wydziału Bioinżynierii Zwierząt w roku 2014 rok

6.3. Opieka nad studentami w kole naukowym

- Koło Naukowe Anatomów Weterynaryjnych, studenci Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, 2015-2017

Efektom współpracy było uzyskanie wstępnych wyników dotyczących struktur nerwowych w sercu u płodów świni, które zostały zaprezentowane na Kongresie naukowym w formie plakatu:

Zmijewska N, Zubkiewicz T, Franke-Radowiecka A, Klimczuk M, Kaleczyc J (2016) *Nerve structures on the base of the heart and their immunohistochemical characterization in porcine fetuses*. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Polska, Lublin, 22-24. IX.2016, materiały zjazdowe str. 50.

6.4. Odbyte kursy i studia podyplomowe podnoszące kwalifikacje dydaktyczne i zawodowe

- Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, rok ukończenia - 1996 (trzy semestry)
- Studia Podyplomowe w zakresie Pedagogiki Szkoły Wyższej, Instytut Pedagogiki, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, rok ukończenia 1998 (dwa semestry)
- Studia Podyplomowe w zakresie „Kultury i wyrazistości mowy”, Wydział Humanistyczny, Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie, rok ukończenia 2003 (dwa semestry)

6.5. Przynależność do Towarzystw

- Polskie Towarzystwo Anatomiczne, członek od 1997 roku.
- Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, członek od 2005 roku.

6.6. Pełnione funkcje

- Od 2010 roku pełnię funkcję Sekretarza Olsztyńskiego Oddziału PTNW, obecnie trwa moja czwarta kadencja.
- Od 2015 do 2019 roku (dwie kadencje) byłam członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie jako przedstawiciel nauczycieli akademickich niebędących samodzielnymi pracownikami naukowo-dydaktycznymi. Jednocześnie pełniłam funkcję członka Komisji Skrutacyjnej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.

6.7. Udział w organizacji Kongresów naukowych, krajowych i międzynarodowych

- X Congress European Neuropeptide Club, Polska, Gdynia, 29.05-01.06. VI, 2013, **członek komitetu organizacyjnego**

Brałam również czynny udział w organizacji innych kongresów naukowych, organizowanych przez Katedrę Anatomii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie (lecz bez przypisanej funkcji):

- Anatomische Gesellschaft - 92. Versammlung and Polish Anatomical Society, Olsztyn, 24-27.V.1997
- XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000
- 12th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club-ENC, Olsztyn, 22-25 May 2002
- XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki, 14-15.09.2006

6.8 Popularyzacja nauki

- Prezentowałam ciekawostki i preparaty anatomiczne oraz wprowadzałam w klimat ćwiczeń z Anatomii Zwierząt młodzież, która odwiedzała naszą Katedrę w trakcie cyklicznego wydarzenia - „Dnia otwartych drzwi UWM”.
- Organizowałam spotkania z dziećmi z przedszkola (Przedszkole Miejskie nr 29 w Olsztynie) oraz szkoły podstawowej (Szkoła Podstawowa nr 15 i 29) w ramach projektu „Poznajemy zawody”.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Wyszczególnienie głównych obszarów zainteresowań naukowych z uwzględnieniem opublikowanych prac oryginalnych z danego zakresu

Moja współpraca z Katedrą Anatomii Zwierząt rozpoczęła się na V roku studiów. Pod kierownictwem i opieką Prof. dr. hab. Mirosława Łakomego, jak również dzięki życzliwości pracowników Katedry Anatomii Zwierząt mogłam nabywać doświadczenie w pracy naukowej, dydaktycznej oraz laboratoryjnej. Moja tematyka badawcza od samego początku związana jest z szeroko rozumianą neuroanatomią. Obszary te dotyczą centralnego i obwodowego układu nerwowego, obejmują autonomiczne i czuciowe unerwienie wielu narządów. Poruszają zagadnienia takie jak rozmieszczenie i wzory kodowania chemicznego włókien nerwowych zaopatrujących różne narządy, źródła zaopatrzenia nerwowego narządów i tkanek oraz plastyczność neuronów w stanach patologicznych i fizjologicznym. Dotyczą też organizacji neurochemicznej poszczególnych składowych obwodowego układu nerwowego włączonych w regulację funkcji narządów wewnętrznych zwierząt domowych. Zdobyta wcześniej wiedza i doświadczenie pozwoliły mi w ostatnich latach na rozszerzenie działalności naukowej o rozwój struktur nerwowych u płodów, co okazało się bardzo fascynującym obszarem i jest niewyczerpanym źródłem tematów do badań.

W prowadzonych przeze mnie badaniach, oprócz tematyki zawartej w omówieniu osiągnięcia (art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy) można wyróżnić kilka głównych obszarów zainteresowań naukowych:

1. Badania dotyczące unerwienia i źródeł zaopatrzenia nerwowego gruczołu sutkowego;
2. Badania dotyczące unerwienia żołądka i jelit, źródeł ich zaopatrzenia, kodowania chemicznego włókien oraz plastyczności neuronów w stanach fizjologicznym i patologicznym;
3. Badania dotyczące unerwienia narządów układu moczowo-płciowego, źródeł zaopatrzenia nerwowego oraz neurochemicznego kodowania struktur nerwowych zaopatrujących te narządy;
4. Inne, dotyczące neurochemicznej organizacji struktur centralnego i obwodowego układu nerwowego.

7.1.1. Badania dotyczące unerwienia i źródeł zaopatrzenia nerwowego gruczołu sutkowego

Tematem unerwienia gruczołu sutkowego u świni, jako ważnego zwierzęcia hodowlanego i stającego się z każdą dekadą bardziej istotnym gatunkiem w badaniach biomedycznych, zajęłam się jeszcze będąc studentką, w ramach działalności w „Studenckim Anatomicznym Kole Naukowym”. Brak danych na temat dystrybucji włókien nerwowych oraz ich chemicznego kodowania zachęcił mnie do przeprowadzenia wstępnych badań na gruczole sutkowym niedojrzałej płciowo świni. Nabywając umiejętności w posługiwaniu się laboratoryjnymi technikami histochemicznymi opracowałam wstępne wyniki dotyczące obecności i rozmieszczenia włókien adrenergicznych i cholinergicznych na terenie gruczołu, które zaprezentowałam w formie referatu podczas „I Krajowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych” we Wrocławiu (1997). Następnym etapem było zapoznawanie się z techniką barwień immunohistochemicznych i wykorzystanie jej do wstępnych obserwacji nad występowaniem i współwystępowaniem we włóknach nerwowych klasycznych substancji biologicznie aktywnych (TH, DβH, NPY, SOM, VIP, SP). Otrzymane dane zaprezentowane zostały w formie plakatu na Kongresie Anatomische Gesellschaft w Olsztynie.

Franke A, Kaleczyc J, Łakomy M (1997) *Preliminary study on the innervation of the mammary gland in the pig*. Anatomische Gesellschaft - 92. Versammlung and Polish Anatomical Society, Olsztyn, 24-27.V.1997, pp. 101.

Rozpoczęte badania kontynuowałam już jako pracownik Katedry Anatomii Zwierząt i powyższa tematyka stała się jedną z ważniejszych w mojej pracy naukowej. Praca doktorska pt. „*Immunochemiczny charakter neuronów zaopatrujących gruczoł mlekowy świni*” obroniona z wyróżnieniem, jak również szereg prac w punktowanych czasopismach naukowych były uwieńczeniem wieloletnich badań.

Gruczoł sutkowy świni należy do obficie zaopatrzonych nerwowo narządów. Bardzo bogate unerwienie dotyczy brodawki sutka, a mniej liczne zakończenia nerwowe zaopatrują miąższ gruczołu, co nie wykracza poza schemat ogólnej dystrybucji włókien nerwowych w gruczole sutkowym człowieka i innych gatunków ssaków. Większość włókien zaopatruje tętnice, przebiegając wzdłuż naczyń lub wnikając do ich mięśniówki. Komórki mięśniowe gładkie, występujące w brodawce sutka, są również unerwione przez liczne włókna nerwowe, które przebiegają równoległe do miocytów. Umiarkowana liczba wypustek nerwowych zaopatruje naczynia żyłne. Jedynie parenchyma gruczołu posiada skąpe unerwienie.

Pojedyncze włókna nerwowe otaczają przewody mleczne, natomiast wiele związanych jest z naczyniami tętniczymi i komórkami mięśniowymi gładkimi, a nieliczne zaopatrują naczynia żyłne i są ułożone obwodowo. Uwzględniając kodowanie chemiczne tych włókien, można wyróżnić wśród nich dwie główne subpopulacje. Jedna z nich reprezentuje włókna czuciowe, zawierające między innymi CGRP, SP, GAL, i/lub NADPH-diaforazę, a druga to aksony adrenergiczne, zawierające TH, DBH, NPY, SOM i/lub VIP. Włókna nerwowe immunoreaktywne dla CGRP i/lub SP zaopatrują skórę, tkankę podskórną gruczołu, a mniej liczne występują na terenie tkanki gruczołowej. CGRP-pozytywne włókna obserwowane są w komórkach mięśniowych gładkich brodawki, wokół przewodów mlecznych, a CGRP/SP-pozytywne w mięśniówce naczyń krwionośnych całego narządu. Pojedyncze GAL-pozytywne włókna nerwowe zaopatrują głównie naczynia krwionośne. U świni najwięcej włókien NADPH-d-pozytywnych jest w skórze, komórkach mięśniowych gładkich i małych tętniczkach, mniej natomiast w parenchymie gruczołu, a pojedyncze przy przewodach mlecznych. Zdecydowana większość wypustek nerwowych wykazuje immunoreaktywność względem TH. Mniej liczne SOM-pozytywne zaobserwowano w komórkach mięśniowych gładkich i naczyniach krwionośnych. Immunoreaktywność wobec NPY występuje w wielu włóknach nerwowych związanych z naczyniami krwionośnymi i pojedynczych, zaopatrujących komórki mięśniowe gładkie. Większość naczyniowych aksonów TH-pozytywnych, zarówno w brodawce, jak i innych regionach gruczołu sutkowego, zawiera NPY. VIP-pozytywne włókna nerwowe występują w ścianach naczyń krwionośnych, przy komórkach mięśniowych gładkich oraz wokół przewodów mlecznych. Wiele nienaczyniowych aksonów TH-pozytywnych zlokalizowanych jest w brodawce, szczególnie w komórkach mięśniowych gładkich i zawiera jednocześnie immunoreaktywność względem SOM, VIP lub GAL. W tkance gruczołowej obserwowane są pojedyncze włókna nerwowe TH/NPY-pozytywne najczęściej w pobliżu nabłonka gruczołowego.

Innym aspektem badań było określenie źródeł zaopatrzenia nerwowego gruczołu sutkowego przy użyciu techniki wstecznego transportu aksonalnego, co stanowiło pionierskie przedsięwzięcie, jeśli chodzi o zwierzęta hodowlane. Po podaniu znacznika neuronalnego Fast Blue (FB) do drugiej i przedostatniej pary sutków (ipsilateralnie, oddzielnie do brodawki i ciała sutka) było możliwe określenie źródeł zaopatrzenia nerwowego gruczołu sutkowego u świni. Badania te potwierdziły przypuszczenia o naturze włókien nerwowych i ujawniły, że pochodzą one ze zwojów rdzeniowych (DRG) i zwojów pnia współczulnego (SChG). Neurony czuciowe zaopatrujące gruczoł sutkowy zlokalizowane są ipsilateralnie w kilku

kolejnych DRG, co sugeruje, że te same neurony mogą zaopatrywać kilka kolejnych gruczołów. Interesującym zjawiskiem jest sposób rozmieszczenia komórek FB+ w zwojach SChG. W przypadku drugiego piersiowego sutka wyznakowane neurony zlokalizowane są praktycznie we wszystkich SChG, począwszy od zwoju gwiaździstego aż do zwojów lędźwiowych. Oprócz głównych centrów nerwowych dla poszczególnych zbadanych sutków, tj. dla drugiego piersiowego – Th10 i Th11, a dla przedostatniego - L1 i L2, istnieją zwoje pnia współczulnego zawierające neurony zaopatrujące obydwie te sutki. Do zwojów tych należą L1--L4. Układ taki sugeruje istnienie zintegrowanych szlaków nerwowych włączonych w przekazywanie informacji między poszczególnymi sutkami i odgrywających prawdopodobnie kluczową rolę w regulacji przepływu krwi przez narząd oraz procesach związanych z wydzielaniem i wydalaniem mleka. Niezależnie prowadzone badania w Katedrze Anatomii Zwierząt, dotyczące źródeł zaopatrzenia nerwowego żeńskich narządów rozrodczych świni, wykazały, że zwoje L1-L4 SChG zawierają również komórki nerwowe, które zaopatrują jajnik, jajowód i macicę. Kodowanie chemiczne neuronów, zaopatrujących gruczoł sutkowy jest zbieżne z obserwacjami przeprowadzonymi na włóknach nerwowych, które zaopatrują ten gruczoł. Potwierdziło to przypuszczenia o istotnej roli włókien afferentnych w procesie aktywacji odruchu wydzielania mleka, a w przypadku włókien efferentnych (adrenergicznych) o roli hamującej, poprzez regulację przepływu krwi przez narząd. Uzyskane wyniki stanowią mocną bazę do projektowania dalszych badań nad funkcjonowaniem gruczołu sutkowego w stanie fizjologicznym i patologicznym.

Przed uzyskaniem stopnia doktora ukazały się dwie prace oryginalne dotyczące rozmieszczenia i immunohistochemicznego charakteru włókien nerwowych zaopatrujących gruczoł sutkowy:

Franke-Radowiecka A, Wąsowicz K (2002) *Adrenergic and cholinergic innervation of the mammary gland in the pig*. Anatomia Histologia Embriologia 31: 3-7, 2002 (IF 0,583; punktacja MNiSW: 11)

Franke-Radowiecka A, Kaleczyc J, Klimczuk M, Łakomy M (2002) *Noradrenergic and peptidergic innervation of the mammary gland in the pig*. Folia Histochemica et Cytobiologica 40:17-25 (IF 0,526; punktacja MNiSW: 10)

Po uzyskaniu stopnia doktora ukazały się kolejne prace oryginalne, rozszerzające tematykę wzoru chemicznego kodowania włókien nerwowych oraz źródeł zaopatrzenia nerwowego

gruczoł sutkowego i immunohistochemicznej charakterystyki perykarionów zaopatrujących ten gruczoł:

Franke-Radowiecka A (2003) *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) – immunoreactive nerve fibres in the mammary gland of the pig*. Folia Morfologica 62:267-270 (IF 0,524; punktacja MNiSW:15)

Franke-Radowiecka A, Całka J, Wąsowicz K, Podlasz P, Kaleczyc J (2004) *The study on the NADPHd-positive innervation of the porcine mammary gland*. Polish Journal of Veterinary Science 7:41-43 (punktacja MNiSW: 6)

Franke-Radowiecka A (2007) *Distribution of neurons supplying the porcine mammary gland*. Anatomia, Histologia, Embriologia 36:139-146 (IF 0, 554; punktacja MNiSW: 15)

Franke-Radowiecka A (2011) *Immunohistochemical characterization of dorsal root ganglia neurons supplying the porcine mammary gland*. Histology and Histopathology, 26:1509-1517 (IF 2,480; punktacja MNiSW: 25)

Franke-Radowiecka A, Wąsowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Zalecki M, Sienkiewicz W (2016) *Immunohistochemical characterization of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine mammary gland*. Anatomia Histologia Embryologia 45:44-50 (IF 0,683; punktacja MNiSW: 20)

Następnym wyzwaniem w zakresie unerwienia gruczołu sutkowego było przeprowadzenie po raz pierwszy badań odnoszących się do bobra europejskiego, gatunku unikatowego i mało poznanego pod względem neuroanatomicznym. W pracy zwrócono uwagę na ogólną morfologię, właściwości immunohistochemiczne włókien nerwowych i różnice w unerwieniu gruczołu sutkowego samicy niedojrzałej i dojrzałej płciowo (nierodzącej). Analiza mikroskopowa gruczołu sutkowego bobra wykazała obecność struktur morfologicznych charakterystycznych dla ssaków. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w cechach morfologicznych gruczołu sutkowego obydwu samic. Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały, że większość włókien nerwowych PGP-pozytywnych, związanych z naczyniami krwionośnymi i komórkami mięśniowymi gładkimi na terenie brodawki i ciała sutka, zawiera jednocześnie DBH. Takie włókna nerwowe są jednak mniej liczne w tkance gruczołowej niż na terenie brodawki. Większość aksonów związanych z naczyniami tętniczymi i komórkami mięśniowymi gładkimi zawiera jednocześnie DβH i NPY. Niewielka liczba włókien DβH/NPY-pozytywnych zaopatruje naczynia żyłne. Włókna zawierające CGRP są częściej spotykane niż te z ekspresją SP.

Franke-Radowiecka A, Giżejowski Z, Klimczuk M, Dudek A, Załęcki M, Jurczak A, Kaleczyc J (2016) *Morphological and neuroanatomical study of the mammary gland in the immature and mature European beaver (Castor fiber)*. Tissue and Cell 48:552-557 (IF 1,232; punktacja MNiSW: 20)

W ostatnim czasie została przyjęta do druku praca przeglądowa dotycząca unerwienia gruczołu sutkowego, uwzględniająca źródła zaopatrzenia nerwowego, jak również kodowanie chemiczne włókien nerwowych i perykarionów zaopatrujących gruczoł. Publikacja podsumowuje dotychczasową wiedzę dotyczącą różnych gatunków zwierząt, biorąc pod uwagę wcześniejsze i najnowsze wyniki badań w tym zakresie.

Franke-Radowiecka A (2021) *The nerve supply of the mammary gland*. Med. Weter. 77:430-436 (IF 0,383; punktacja MEiN: 20)

Pomimo dobrze poznanego schematu unerwienia tego gruczołu u różnych gatunków w okresie niedojrzałości płciowej lub po jej osiągnięciu, nadal jest brak informacji na temat zmian w jego unerwieniu w różnych fazach cyklu, ciąży i laktacji. Jak wiadomo, hormony mają modulujący wpływ na unerwienie narządów układu rozrodczego oraz na immunohistochemiczne kodowanie włókien, np. ciężarnej macicy. Natomiast obecność neuronów zaopatrujących narządy żeńskiego układu rozrodczego i gruczołu sutkowego w tych samych zwojach nerwowych u świni przywodzi na myśl kolejny kierunek badań, polegający na weryfikacji hipotezy, że unerwienie tych narządów może mieć powiązanie z etiologią wielu schorzeń, w tym np. zespołu MMA. Każda nowa informacja, dotycząca unerwienia gruczołu sutkowego jako unikatowego gruczołu występującego u ssaków, może mieć wpływ na lepsze rozumienie mechanizmów neuroendokrynych związanych z układem rozrodczym i wnieść nowe spojrzenie na problemy hodowlane.

7.1.2. Badania dotyczące unerwienia żołądka i jelit, źródeł ich zaopatrzenia, kodowania chemicznego włókien oraz plastyczności neuronów w stanach patologicznych i fizjologicznym

Kolejnym tematem, któremu poświęciłam wiele uwagi, było unerwienie jelit i żołądka. Wzięłam udział w badaniach prowadzonych w Katedrze, które obejmowały zlokalizowanie i ujawnienie chemicznego kodowania neuronów autonomicznych włączonych w regulację funkcji jelita biodrowego świni. Głównie zajmowałam się immunohistochemiczną charakterystyką neuronów CSMG i IMG projektujących do tego jelita, jak również wzorem chemicznym struktur nerwowych znajdujących się w ścianie jelita biodrowego. Prace związane z tym tematem realizowałam w Katedrze, jak również na stażu w Belgii, o czym wspominałam wcześniej.

Następnym etapem było określenie zmian jakościowych i ilościowych w kodowaniu chemicznym neuronów zaopatrujących jelito biodrowe, po eksperymentalnym wywołaniu stanu zapalnego. W IMG stan zapalny jelita powoduje wzrost gęstości terminalnych włókien nerwowych zawierających NPY, VIP i Leu-enkefalinę (LENK) przy niezmienionej zawartości NPY, VIP, NOS, LENK i GAL w perykarionach. W CSMG stan zapalny indukuje wzrost liczby włókien nerwowych GAL- i SP-pozytywnych. Dane ilościowe (Test ELISA) również wykazały, iż w ścianie jelita biodrowego, będącego w stanie zapalnym, spada zawartość VIP, CGRP i SOM, a wzrasta zawartość SP, NPY i GAL w porównaniu do wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Uzyskane wyniki dostarczyły wielu cennych informacji potwierdzających przypuszczenia, że badane peptydy odgrywają istotną rolę jako czynniki prozapalne lub antyzapalne i mogą stanowić przydatne narzędzie w profilaktyce bądź leczeniu stanów zapalnych przewodu pokarmowego.

Moje zainteresowania dotyczyły również unerwienia żołądka i możliwości adaptacyjnych neuronów w jego stanach chorobowych. U zwierząt w przebiegu dyzenterii (gastrocolitis infectiosa suum) największe zmiany w chemicznym kodowaniu neuronów dotyczą splotu podśluzówkowego i obejmują wyraźny wzrost liczby komórek nerwowych GAL- i VACHT-pozytywnych w stosunku do zwierząt kontrolnych (GAL - wzrost z 15-18% do 63%; VACHT – wzrost z 56% do 86%). Wskazuje to na bardzo istotny udział i rolę tych substancji w stanie zapalnym żołądka w przebiegu dyzenterii.

Po uzyskaniu stopnia doktora ukazały się oryginalne prace z tego zakresu

Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M, Timmermans JP (2004) *The distribution and chemical coding of neurons in the celiac-superior mesenteric ganglion complex supplying the normal and inflamed ileum in the pig*. Polish Journal of Veterinary Sciences 7:199-101 (punktacja MNiSW: 6)

Kaleczyc J, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M (2007) *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. 36:186-193 (IF 0,554; punktacja MNiSW: 15)

Brałam także udział w badaniach, które dotyczyły określenia ekspresji galaniny w neuronach splotu mięśniówkowego i podśluzówkowego występujących w różnych lokalizacjach ściany żołądka, a także weryfikacji wpływu owrzodzenia dystalnej części

żołądka na zmianę ekspresji tego neuropeptydu, jako czynnika bardzo mocno zaangażowanego w procesy zapalne.

Badania te po raz pierwszy ujawniły, że na terenie jamy odźwiernika (żołądka od zdrowych zwierząt) $29,4 \pm 1,1\%$ neuronów mięśniówkowych i $67,7 \pm 0,5\%$ podśluzówkowych wykazuje ekspresję dla galaniny, natomiast w ścianie ujścia odźwiernika odpowiednio $16,14 \pm 2,06\%$ i $64,84 \pm 2,74\%$. Większość GAL-pozytywnych neuronów mięśniówkowych, obszaru obejmującego ujście odźwiernika, jest zlokalizowana w głębokich warstwach mięśniówki okrężnej narządu. Wrzody występujące w dystalnej części żołądka znacząco wpływają na wzrost GAL-pozytywnych perykarionów mięśniówkowych z pominięciem tkanek graniczących z wrzodem. W przypadku grupy neuronów podśluzówkowych wyraźny wzrost dotyczy wycinka tkanki bezpośrednio graniczącej z owrzodzeniem. Następnie, zastosowanie technik Q-PCR pozwoliło na weryfikację hipotezy o wpływie owrzodzenia dystalnej części żołądka na zmianę ekspresji genów kodujących GAL i receptorów (GalR1, GalR2, GalR3) w badanych lokalizacjach. Analiza uzyskanych wyników częściowo potwierdziła zakładane zmiany, ponieważ ekspresja genu kodującego galaninę wzrosła na terenie ściany ujścia odźwiernikowego żołądka zwierząt eksperymentalnych, a ekspresja wszystkich receptorów galaninerгіcznych wzrosła tylko w tkankach bezpośrednio graniczących z wrzodem. Na terenie ujścia odźwiernikowego wzrost dotyczy jedynie ekspresji receptora GalR1.

Załęcki M, Sienkiewicz W, Franke-Radowiecka A, Klimczuk M, Kaleczyc J (2016) *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*. PloS One 11(5):e0155658 (IF 2,806; punktacja MNiSW: 35)

Zalecki M, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Wojtkiewicz J, Kaleczyc J (2018) *Galaninergic intramural nerve and tissue reaction to antral ulcerations*. Neurogastroenterol Motil. 30(7):e13360. doi: 10.1111/nmo.13360 (IF 2,806; punktacja MNiSW: 30)

Upośledzenie funkcji żołądka w chorobie wrzodowej sugeruje zmiany w autonomicznych odruchach nerwowych kontrolowanych przez zwój węzłowy, co prowadzi do dysfunkcji żołądka. Zanotowany został 2,72-krotny wzrost liczby GAL-pozytywnych neuronów w zwoju węzłowym, pochodzącym od zwierząt z owrzodzeniem dystalnej części żołądka i 1,45-krotny wzrost mRNA GalR3 w porównaniu z kontrolami. Nie zaobserwowano różnic między grupami dla GalR1 lub GalR2. To badanie potwierdziło zmiany w kodowaniu chemicznym neuronów zwoju węzłowego w przypadku owrzodzenia żołądka i po raz

pierwszy wykazało ekspresję mRNA kodującego wszystkie podtypy receptora galaninowego w zwoju węzłowym u świni.

Zalecki M, Juranek J, Pidsudko Z, Mogielnicka-Brzozowska M, Kaleczyc J, Franke-Radowiecka A (2020) *Inferior vagal ganglion galaninergic response to gastric ulcers*. PLoS One. 15(11):e0242746.. (IF 3,240; punktacja MNiSW: 100)

Ostatnio opublikowane wyniki badań miały na celu zweryfikowanie zmian ekspresji transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART), za pomocą Q-PCR (gen kodujący CART w tkance) i metody podwójnych barwień immunohistochemicznych połączonych z mikroskopią konfokalną (immunofluorescencja CART w jelitowym układzie nerwowym) w ścianie żołądka świni, w okolicy owrzodzenia. Temat badań został podjęty ze względu na przypuszczenia, że CART odgrywa rolę w reakcji narządów przewodu pokarmowego na stany patologiczne. Owrzodzenie żołądka jest częstym schorzeniem nie tylko u ludzi, ale również u zwierząt. Do tej pory rola CART w chorobie wrzodowej żołądka oraz ekspresja genu kodującego CART w przewodzie pokarmowym świni, jako cennego modelu badań w odniesieniu do człowieka, nie została poznana. Wyniki ujawniły, że wrzód żołądka spowodował znaczny spadek ekspresji genu kodującego CART oraz znaczne zmniejszenie liczby CART-pozytywnych neuronów mięśniówkowych i włókien nerwowych zlokalizowanych w obrębie określonej warstwy mięśniowej. Wyniki wskazują na unikalną, zależną od CART odpowiedź żołądka na chorobę wrzodową.

Zalecki M, Plywacz A, Antushevich A, Franke-Radowiecka A (2021) *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART) Expression Changes in the Stomach Wall Affected by Experimentally Induced Gastric Ulcerations*. 2021 Int. J. Mol. Sci., 22:7437. doi:10.3390/ijms22147437 (IF 5,923; punktacja MEiN: 140)

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących organizacji śródściennego unerwienia odźwiernika żołądka u bobra europejskiego. Pomimo specyficznej budowy żołądka u tego gatunku unerwienie jest podobne do unerwienia obserwowanego u innych ssaków. Neurony splotów śródściennych zawierają charakterystyczne neuroprzekaźniki dla prawidłowej regulacji pracy przewodu pokarmowego.

Zalecki M, Makowska K, Gizejewski Z, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Kasica-Jarosz N, Sienkiewicz W (2019) *Enteric nervous system in the European beaver (Castor fiber) pylorus - an immunohistochemical study*. Pol J Vet Sci. 2019 22:101-107 (IF 0,516 punktacja MNiSW: 40)

7.1.3 Badania dotyczące unerwienia narządów układu moczowo-płciowego, źródeł zaopatrzenia nerwowego oraz neurochemicznego kodowania struktur nerwowych zaopatrujących te narządy.

Z uwagi na fakt, że w Katedrze Anatomii Zwierząt wiele realizowanych tematów badawczych związanych było z organizacją unerwienia narządów układu moczowego, rozrodczego męskiego i żeńskiego, zainteresowania tą tematyką sięgają początków mojej pracy zawodowej. Wnikliwie śledzenie powstającej cennej bazy danych pozwoliło zwrócić uwagę na pewne korelacje pomiędzy funkcjonowaniem gruczołu sutkowego i żeńskiego układu rozrodczego na poziomie nerwowym. Inną konsekwencją śledzenia tych danych jest podjęcie się kolejnych wyzwań, tym razem związanych z rozwojem unerwienia żeńskich narządów rozrodczych u płodów świni.

Badania dotyczące tematyki unerwienia układu moczowo-płciowego, w których bezpośrednio uczestniczyłam, obejmują następujące zagadnienia: dystrybucję efferentnych neuronów zaopatrujących jajowód u świni, immunohistochemiczną charakterystykę cholinergicznym włókien nerwowych zaopatrujących gruczoły płciowe dodatkowe samca świni, czy dystrybucję i chemiczne kodowanie neuronów zwoju aortalno-nerkowego i jądrowego projektujących do wierzchołka pęcherza moczowego u świni.

Przed uzyskaniem stopnia doktora ukazała się praca oryginalna obejmująca tematykę projekcji efferentnych do jajowodu świni.

Neurony CSMG, IMG i zwoju jajnikowego są głównymi źródłami zaopatrzenia jajowodu u świni, mniej ich pochodzi ze zwoju aortalno-nerkowego i nadnerczowego, zaś najmniej neuronów projektujących do jajowodu obserwowano w SChG (T14-L5). Po raz pierwszy zbadano źródła zaopatrzenia nerwowego jajowodu u świni przy użyciu metody wstecznego transportu aksonalnego.

Czaja K, Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Łakomy M (2001) *Distribution of efferent neurons innervating the oviduct in the pig*. Folia Morphologica 60:243-248 (punktacja MNiSW: 4)

Po uzyskaniu stopnia doktora ukazały się kolejne prace:

Celem badań udokumentowanych w jednej z publikacji było ujawnienie występowania i kolokalizacji VACHT, DβH oraz niektórych neuropeptydów, w tym VIP,

NPY i SOM we włóknach nerwowych zaopatrujących gruczoły płciowe dodatkowe u samca niedojrzałej płciowo świni. Podwójne barwienia immunohistochemiczne wykazały, że zakończenia nerwowe VAcHT-pozytywne są nieadrenergiczne, ale wiele z nich wykazuje immunoreaktywność wobec VIP, NPY i/lub SOM. Wzory współistnienia tych biologicznie czynnych substancji we włóknach nerwowych zaopatrujących poszczególne gruczoły są podobne, ale gęstość unerwienia cholinergicznego jest różna w poszczególnych narządach. Unerwienie gruczołu pęcherzykowego i trzonu prostaty jest lepiej rozwinięte niż części rozsianej i gruczołu opuszkowo-cewkowego. Większość cholinergicznym włókien nerwowych związanych z naczyniami krwionośnymi zaopatrującymi gruczoły zawiera VIP i NPY oraz w mniejszym stopniu SOM. Jest to pierwsze kompleksowe badanie dotyczące kodowania chemicznego cholinergicznym włókien nerwowych zaopatrujących gruczoły płciowe dodatkowe u świni.

Klimczuk M, Kaleczyc J, Franke-Radowiecka A, Czaja K, Podlasz P, Łakomy M (2005) *Immunohistochemical characterization of cholinergic nerve fibres supplying accessory male genital glands in the pig*. *Veterinari Medicina*, 50:119-130 (IF 0,621; punktacja MNiSW: 20)

Wykorzystując metodę wstecznego transportu aksonalnego i podwójnych barwień immunohistochemicznych, po raz pierwszy zostało zbadane rozmieszczenie i kodowanie chemiczne neuronów zwoju aortalno-nerkowego i jądrowego projektujących do wierzchołka pęcherza moczowego u niedojrzałego płciowo samca świni. Stwierdzono, że badane zwoje zawierają wiele neuronów zaopatrujących wspomnianą część pęcherza. Wyznakowane perykariony (FB-pozytywne) w większości zawierały TH- i/lub DBH i wiele z nich jednocześnie wykazywało immunoreaktywność względem NPY, SOM lub GAL. Neurony te otoczone były przez liczne VAcHT- lub NOS-pozytywne włókna nerwowe. Badanie to ujawniło stosunkowo dużą populację różnie kodowanych neuronów zwoju aortalno-nerkowego i jądrowego projektujących do pęcherza moczowego świni. Sądząc po ich neurochemicznej organizacji, te komórki nerwowe stanowią ważny element złożonego układu neuroendokrynnego zaangażowanego w regulację funkcji narządów moczowo-płciowych świni.

Pidsudko Z, Listowska Ż, Franke-Radowiecka A, Klimczuk M, Załęcki M, Kaleczyc J (2019) *Distribution and chemical coding of urinary bladder apex-projecting neurons in aorticorenal and testicular ganglia of the male pig*. *Pol J Vet Sci*. 22:427-430 (IF 0,516; punktacja MNiSW: 40)

7.1.4. Inne, dotyczące neurochemicznej organizacji struktur centralnego i obwodowego układu nerwowego.

Do tej części zaliczyłam prace oryginalne, których tematyka nie daje się przyporządkować do żadnego z głównych kierunków zainteresowań naukowych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Ważnym i ciekawym przedsięwzięciem, w którym miałam przyjemność współuczestniczyć, było określenie źródeł zaopatrzenia nerwowego wybranych obszarów tkanki tłuszczowej u świni. W związku z danymi, że tkanka tłuszczowa jest zaopatrzona przez włókna adrenergiczne, a badania fizjologiczne wykazały, iż metabolizm tej tkanki jest kontrolowany przez współczulny układu nerwowego, podjęto się zbadania źródeł pochodzenia włókien nerwowych, zaopatrujących tkankę tłuszczową podskórną, okołonerkową i trzewną. Otrzymane wyniki wykazały, że neurony FB-pozytywne, zaopatrujące podskórną tkankę tłuszczową, umieszczone są w odcinku piersiowo-lędźwiowym SChG. Natomiast neurony, zaopatrujące okołonerkową i trzewną tkankę tłuszczową, obserwowano zarówno w SChG, jak i w zwojach przedkręgowych. Uzyskane dane po raz pierwszy określiły pochodzenie włókien współczulnych zaopatrujących różne obszary tkanki tłuszczowej u świni i mogą być wykorzystane w opracowaniu praktycznej metody kontrolowania przyrostu tej tkanki u świń, co ma znaczenie ekonomiczne w przemyśle trzody chlewnej.

Powyższe badania realizowane były w ramach międzynarodowego projektu badawczego *Early Career Cooperative Research Awards 2/99*, finansowanego przez *United States Department of Agriculture and Ministry of Agriculture and Food Economy of Poland*. Kierownikiem projektu był Prof. Robert Kraeling (Animal Physiology Research Unit, Richard B. Russell Agricultural Research Center, Athens, USA), głównym wykonawcą dr Krzysztof Czaja, obecnie Associate Professor, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, USA. Projekt realizowany był w Katedrze Anatomii Zwierząt i w zagranicznym ośrodku. Osobiście uczestniczyłam w zadaniach badawczych realizowanych w Katedrze Anatomii Zwierząt. Polegały one na uczestnictwie w zabiegach operacyjnych, mikroskopowej analizie preparatów, opracowaniu części dokumentacji zdjęciowej i opracowaniu wyników dotyczących źródeł zaopatrzenia nerwowego (w szczególności) podskórnej tkanki tłuszczowej. Efektem tej współpracy była możliwość zaprezentowania uzyskanych wyników

na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, jak również przedstawienia ich w publikacji:

Czaja K, Kraeling RR, Klimczuk M, Franke A, Łakomy M. *Distribution of neurons supplying the mesentery fat in the pig*. ASGBI/AG/NAV Tripartite Meeting St John's College Cambridge, 24-26 July 2000, p. 60

Klimczuk M, Czaja K, Franke-Radowiecka A, Łakomy M, Kraeling RR.. *Distribution of neurons supplying the perirenal fat in the pig*. XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000, p. 23

Franke-Radowiecka A, Czaja K, Klimczuk M, Kraeling RR, Łakomy M. *Distribution of neurons supplying the subcutaneous fat in the pig*. XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000, p. 16

Klimczuk M, Czaja K, Franke-Radowiecka A, Łakomy M, Kraeling RR. *Dystrybucja neuronów zaopatrujących okołonerkową tkankę tłuszczową u świni*. XI Kongres PTNW, Lublin, 21-23.IX.2000, p. 60

Franke-Radowiecka A, Czaja K, Klimczuk M, Kraeling RR, Łakomy M. *Dystrybucja neuronów zaopatrujących podskórną tkankę tłuszczową u świni*. XI Kongres PTNW, Lublin, 21-23.IX.2000, p. 44

Czaja K, Kraeling RR, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Łakomy M (2002) *Distribution of ganglionic sympathetic neurons supplying the subcutaneous, perirenal and mesentery fat tissue depots in the pig*. Acta Neurobiol. Exp. 62:227-234 (IF 0,910; punktacja MNiSW: 8)

Po uzyskaniu stopnia doktora

Jestem współautorem publikacji dotyczące centralnego układu nerwowego. Badania obejmują rozmieszczenia neuronów CGRP-pozytywnych na terenie istoty szarej odcinka piersiowo-lędźwiowego rdzenia kręgowego u świni. Za pomocą podwójnych barwień immunohistochemicznych wykazano, że oprócz występowania neuronów CGRP-pozytywnych w rogach dogrzebietowych obserwowano je także w istocie pośrednio-bocznej i pośrednio-przyśrodkowej, jak również na terenie jąder ruchowych (rogi dobrzuszne). Oznacza to, że CGRP związany jest nie tylko z przekazywaniem impulsów czuciowych, ale również autonomicznych i ruchowych. Wiele perykarionów zawierało CGRP i ChAT jednocześnie, co jednoznacznie potwierdza powyższy wniosek.

Całka J, Franke-Radowiecka A, Załęcki M, Łakomy M (2009) *Evidence for coexistence of choline acetyltransferase (ChAT) – and calcitonin gene-related peptide (CGRP) – immunoreactivity in the thoracolumbar and sacral spinal cord neurons of the pig*. Pol. J. Vet. Sci. 12:61-67 (IF 0,435; punktacja MNiSW: 15)

Uczestniczyłam także w zadaniu, którego celem było zbadanie kodowania chemicznego neuronów w zwoju żuchwowym i włókien nerwowych zaopatrujących gruczoł żuchwowy samca świni z wykorzystaniem metody podwójnych barwień immunohistochemicznych i RT-PCR. Ślinianka żuchwowa świni okazała się bogato zaopatrzona we włókna nerwowe VAcHT-pozytywne, które otaczają przewody między- i śródplacikowe. Wokół pęcherzyków znajdują się również duża liczba zakończeń nerwowych VAcHT-pozytywnych. Wiele włókien nerwowych okołoprzewodowych i okołopęcherzykowych zawiera DβH. Immunoreaktywność wobec GAL, NPY lub VIP występuje w umiarkowanej liczbie zakończeń nerwowych, które są związane zarówno z przewodami ślinowymi, jak i pęcherzykami. Podwójne barwienia wykazały, że w zwoju żuchwowym prawie wszystkie neurony barwią się dodatnio względem VAcHT/ChAT ($98,45 \pm 0,59\%$) i nNOS ($99,71 \pm 0,18\%$). Umiarkowana liczba ciał komórek nerwowych zawierała NPY lub VIP (odpowiednio $18,67 \pm 0,52\%$ i $8,11 \pm 0,36\%$). Zaobserwowano również pojedyncze neurony GAL- i CGRP-pozytywne. RT-PCR ujawnił obecność transkryptów ChAT, VAcHT, nNOS, NPY, VIP i GAL. W przypadku SP i DβH stwierdzono bardzo słabe sygnały.

Klimczuk M, Podlasz P, Sienkiewicz W, Franke-Radowiecka A, Dudek A, Chmielewska-Krzesińska M, Pidsudko Z, Kaleczyc J (2016) *Immunohistochemical characterization of neurons in the mandibular ganglion and nerve fibres supplying the porcine mandibular gland*. *Veterinarni Medicina* 61:361-373 (IF 0,489; punktacja MNiSW: 25)

Tematyka doniesień zjazdowych (45 pozycji) obejmuje zagadnienia zawarte w moich głównych zainteresowaniach naukowych, jak również opisuje uzyskane wyniki badań z innych obszarów, nie wskazanych powyżej.

Wykaz doniesień zjazdowych zawarty został w *Załączniku nr 5*.

7.2. Dane naukometryczne

Jestem autorem lub współautorem łącznie **70** publikacji naukowych. W ich skład wchodzi **24** prace oryginalne, **1** praca przeglądowa oraz **45** doniesień zjazdowych, prezentowanych w formie referatu lub plakatu na polskich i zagranicznych konferencjach naukowych. Jestem pierwszym autorem w **12** pracach i w **17** doniesieniach zjazdowych. Wszystkie opublikowane prace mieszczą się na liście A JCR (Journal Citation Report).

Summaryzna wartość IF wszystkich moich prac naukowych, liczona według roku publikacji wynosi **31,973**. Liczba punktów przyznawanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, a od 2021 roku przez Ministerstwo Edukacji i Nauki liczona wg roku publikacji ogółem wynosi **890**. Aktualny indeks Hirscha (IH), liczony według Bazy Web of Science to **6**, a liczba cytowań - **111**, natomiast według bazy Scopus – IH **8**, a liczba cytowań - **141**.

Analiza bibliometryczna mojego dorobku naukowego opracowana została przez pracownika Biblioteki Uniwersyteckiej, UWM w Olsztynie, Oddziału Informacji Naukowej i Czytelni czasopism w dniu 02.08.2021. Analizę sporządzono na podstawie bazy Bibliografii Publikacji Pracowników Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Olsztyn 23.08.2021

Amelia Franke-Radowiecka

**Wykaz osiągnięć naukowych albo
artystycznych, stanowiących znaczny wkład w
rozwój określonej dyscypliny**

**dr n. wet.
Amelia Franke-Radowiecka**

Katedra Anatomii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2021

I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a Ustawy; lub

2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy:

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Morfologia i cechy neurochemiczne struktur obwodowego autonomicznego i czuciowego układu nerwowego związanych z unerwieniem serca i żeńskich narządów rozrodczych u świni w okresie prenatalnym.”

Cykl ten obejmuje 3 publikacje w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 5,899, a łączna liczba punktów MNiSW to 280.

I.2.1. Franke-Radowiecka A., Prozorowska E., Zalecki M., Jackowiak H., Kaleczyc J. (2019) Innervation of internal female genital organs in the pig during prenatal development. *Journal of Anatomy* 235(5):1007-1017. doi: 10.1111/joa.13052. IF 2,013; punktacja MNiSW: 140

Praca została wyróżniona nagrodą JM Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za najlepszy artykuł naukowy lub dzieło artystyczne opublikowane w 2019r.

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu większości barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej (mikroskop konfokalny) preparatów, interpretacji i opracowaniu wyników, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej oraz opracowaniu manuskryptu.

I.2.2. Franke-Radowiecka A. (2020) Paracervical ganglion in the female pig during prenatal development: morphology and immunohistochemical characteristics. *Histology and Histopathology* 35(11):1363-1377. doi: 10.14670/HH-18-287 IF 2.303; punktacja MNiSW: 70

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej, interpretacji i opracowaniu wyników, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej oraz opracowaniu manuskryptu.

I.2.3. Franke-Radowiecka A., Zmijewska N., Zubkiewicz T., Zalecki M., Klimczuk M., Listowska Ż., Kaleczyc J. (2020) Nerve structures of the heart and their immunohistochemical characterization in 10-week-old porcine fetuses. *Comptes Rendus Biologies* 343(1):53-62. doi: 10.5802/crbio1.4. IF 1,583; punktacja MNiSW: 70

Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału, opracowaniu metodyki, wykonaniu większości barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, interpretacji i opracowaniu wyników, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej oraz opracowaniu manuskryptu.

Oświadczenia współautorów, wskazujące na merytoryczny udział w powstaniu każdej pracy, zostały zamieszczone w załączniku nr 5 dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust.1. pkt 2c Ustawy

II INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

3. Informacja o członkowstwie w redakcjach naukowych monografii.

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

Przed otrzymaniem stopnia doktora

II.4.1 Czaja K, Kaleczyc J, Pidsudko Z, **Franke-Radowiecka A**, Łakomy M (2001) Distribution of efferent neurons innervating the oviduct in the pig. Folia Morphologica 60:243-248 (punktacja MNiSW: 4)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych i częściowej mikroskopowej analizie preparatów.

II.4.2. Franke-Radowiecka A, Wąsowicz K (2002) Adrenergic and cholinergic innervation of the mammary gland in the pig. Anatomia Histologia Embriologia 31:3-7 (IF 0,583; punktacja MNiSW: 11)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień histochemicznych i immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, opracowaniu wyników i redakcji manuskryptu.

II.4.3. Franke-Radowiecka A, Kaleczyc J, Klimczuk M Łakomy M (2002) Noradrenergic and peptidergic innervation of the mammary gland in the pig. Folia Histochemica et Cytobiologica 40:17-25 (IF 0,526; punktacja MNiSW: 10)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, opracowaniu wyników i redakcji manuskryptu.

II.4.4 Czaja K, Kraeling RR, Klimczuk K, **Franke-Radowiecka A**, Łakomy M (2002) Distribution of ganglionic sympathetic neurons supplying the subcutaneous, perirenal and mesentery fat tissue depots in the pig. Acta Neurobiologiae Experimentalis 62:227-234 (IF 0,910; punktacja MNiSW: 8)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych, mikroskopowej analizie preparatów, opracowaniu części dokumentacji zdjęciowej i opracowaniu wyników dotyczących źródeł zaopatrzenia nerwowego podskórnej tkanki tłuszczowej oraz redakcji części manuskryptu.

Po uzyskaniu stopnia doktora

II.4.5. Franke-Radowiecka A (2003) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) – immunoreactive nerve fibres in the mammary gland of the pig. *Folia Morfologica* 62:267-270 (punktacja MNiSW: 5)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów i opracowaniu dokumentacji zdjęciowej, opracowaniu wyników i redakcji manuskryptu.

II.4.6. Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M, Timmermans J-P (2004) The distribution and chemical coding of neurons in the celiac-superior mesenteric ganglion complex supplying the normal and inflamed ileum in the pig. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7:199-101 (punktacja MNiSW: 6)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych, udziale w przygotowaniu preparatów mrożeniowych, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, częściowym przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej i opracowaniu wyników dotyczących głównie zdrowej tkanki.

II.4.7. Franke-Radowiecka A, Całka J, Wąsowicz K, Podlasz P, Kaleczyc J (2004) The study on the NADPHd-positive innervation of the porcine mammary gland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7:41-43 (punktacja MNiSW: 6)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, opracowaniu i interpretacji wyników i redakcji manuskryptu.

II.4.8. Klimczuk M, Kaleczyc J, Franke-Radowiecka A, Czaja K, Podlasz P, Łakomy M (2005) Immunohistochemical characterization of cholinergic nerve fibres supplying accessory male genital glands in the pig. *Veterinarni Medicina*, 50:119-130 (IF 0,621; punktacja MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na pomocy przy pobieraniu materiału, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych i częściowej analizie mikroskopowej preparatów.

II.4.9. J. Kaleczyc, M. Klimczuk, A. Franke-Radowiecka, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M (2007) The distribution and chemical coding of intramural neurons supplying the porcine stomach – the study on normal pigs and on Animals suffering from swine dysentery. *Anatomia Histologia Embryologia* 36:186-193 (IF 0,554; punktacja MNiSW: 15)

Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, Doroczna Naukowa Nagroda II Stopnia za Rok 2007, za współautorstwo pracy

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych, częściowej analizie mikroskopowej skrawków pochodzących z żołądka zdrowych i chorych zwierząt, opracowaniu i interpretacji części wyników.

II.4.10. Franke-Radowiecka A (2007) Distribution of neurons supplying the porcine mammary gland. *Anatomia, Histologia, Embriologia* 36:139-146 (IF 0,554; punktacja MNiSW: 15)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, analizie mikroskopowej preparatów, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, opracowaniu wyników i redakcji manuskryptu.

II.4.11. Całka J, Franke-Radowiecka A, Załęcki M, Łakomy M (2009) Evidence for coexistence of choline acetyltransferase (ChAT)- and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactivity in the thoracolumbar and sacral spinal cord neurons of the pig. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12:61-67 (IF 0,435; punktacja MNiSW: 15)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na częściowym opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu części metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, przygotowaniu części dokumentacji zdjęciowej i opracowaniu wyników.

II.4.12. Franke-Radowiecka A (2011) Immunohistochemical characterization of dorsal root ganglia neurons supplying the porcine mammary gland. *Histology and Histopathology* 26:1509-1517 (IF 2,480; punktacja MNiSW: 25)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej i wyników badań oraz redakcji manuskryptu.

II.4.13. Klimczuk M, Podlasz P, Sienkiewicz W, Franke-Radowiecka A, Dudek A, Chmielewska-Krzesińska M, Pidsudko Z, Kaleczyc J (2016) Immunohistochemical characterization of neurons in the mandibular ganglion and nerve fibres supplying the porcine mandibular gland. *Veterinarni Medicina* 61:361-373 (IF 0,489; punktacja MNiSW: 25)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na pomocy przy pobieraniu materiału, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych i częściowej analizie wyników.

II.4.14. Franke-Radowiecka A, Giżejowski Z, Klimczuk M, Dudek A, Załęcki M, Jurczak A, Kaleczyc J (2016) Morphological and neuroanatomical study of the mammary gland in the immature and mature European beaver (*Castor fiber*). *Tissue and Cell* 48:552-557 (IF 1,232; punktacja MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, opracowaniu dokumentacji zdjęciowej i wyników badań oraz redakcji manuskryptu.

II.4.15. Franke-Radowiecka A, Wąsowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Załęcki M, Sienkiewicz W (2016) Immunohistochemical characterization of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine mammary gland. *Anatomia Histologia Embryologia* 45:44-50 (IF 0,683; punktacja MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu barwień immunohistochemicznych, analizie mikroskopowej preparatów, częściowym opracowaniu dokumentacji zdjęciowej, opracowaniu wyników badań i redakcji manuskryptu.

II.4.16. Załęcki M, Sienkiewicz W, Franke-Radowiecka A, Klimczuk M, Kaleczyc J (2016) 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. *PLoS One* 11: e0155658 (IF 2,806; punktacja MNiSW: 35)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych, częściowej analizie mikroskopowej skrawków pochodzących z żołądka zdrowych i chorych zwierząt.

II.4.17. Zalecki M, Pidsudko Z, **Franke-Radowiecka A**, Wojtkiewicz J, Kaleczyc J (2018) Galaninergic intramural nerve and tissue reaction to antral ulcerations. *Neurogastroenterology & Motility* 30:e13360. doi: 10.1111/nmo.13360 (IF 3,803 punktacja MNiSW: 30)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asyście przy zabiegach operacyjnych, wykonaniu części barwień immunohistochemicznych, częściowej analizie mikroskopowej preparatów.

II.4.18. Zalecki M, Makowska K, Gizejewski Z, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Kasica-Jarosz N, Sienkiewicz W (2019) Enteric nervous system in the European beaver (*Castor fiber*) pylorus - an immunohistochemical study. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 22:101-107 (IF 0,516; punktacja MNiSW: 40)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu części barwień immunohistochemicznych i częściowej analizie wyników.

II.4.19. Pidsudko Z, Listowska Ż, **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Załęcki M, Kaleczyc J (2019) Distribution and chemical coding of urinary bladder apex-projecting neurons in aorticorenal and testicular ganglia of the male pig. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 22:427-430 (IF 0,516; punktacja MNiSW: 40)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu części barwień immunohistochemicznych i częściowej analizie mikroskopowej preparatów.

II.4.20. Zalecki M, Juranek J, Pidsudko Z, Mogielnicka-Brzozowska M, Kaleczyc J, **Franke-Radowiecka A** (2020) Inferior vagal ganglion galaninergic response to gastric ulcers. *PLoS One* 23;15(11):e0242746 (IF 3,240; punktacja MNiSW: 100)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na częściowej analizie mikroskopowej skrawków pochodzących z żołądka, udziale w interpretacji i opracowaniu wyników.

II.4.21. **Franke-Radowiecka A.** The nerve supply of the mammary gland. *Medycyna Weterynaryjna* 77:430-436 (IF 0,383; punktacja MEiN: 20)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zebraniu i konsolidacji danych, opracowaniu koncepcji i redakcji manuskryptu.

II.4.22. Zalecki M., Plywacz A., Antushevich A., **Franke-Radowiecka A** (2021) Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART) Expression Changes in the Stomach Wall Affected by Experimentally Induced Gastric Ulcerations. *International Journal of Molecular Sciences* 22:7437. doi:10.3390/ijms22147437 (IF 5,923; punktacja MEiN: 140)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na częściowej analizie mikroskopowej skrawków pochodzących z żołądka, udziale w interpretacji i opracowaniu wyników.

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt.I.3).

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3)

7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych , z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

II.7.1. Franke A, Kaleczyc J, Łakomy M. Preliminary study on the innervation of the mammary gland in the pig. *Anatomische Gesellschaft - 92. Versammlung and Polish Anatomical Society, Olsztyn, 24-27.V.1997, pp. 101.*

II.7.2. Franke-Radowiecka A, Majewski M, Kaleczyc J, Łakomy M. Axotomy-induced peptide-plasticity of ovary-projecting sympathetic chain ganglia neurons in the pig. *XVIII Zjazd PTA oraz XXXIV Sympozjum PTHiC, Łódź, 26-29.06.1999r. Folia Morphologica, Vol. 58, No 1, 1999.*

II.7.3. Czaja K, Kraeling RR, Klimczuk M, **Franke A**, Łakomy M. Distribution of neurons supplying the mesentery fat in the pig. *ASGBI/AG/NAV Tripartite Meeting St John's College Cambridge, 24-26 July 2000, p. 60*

II.7.4. Klimczuk M, Czaja K, **Franke-Radowiecka A**, Łakomy M, Kraeling RR.. Distribution of neurons supplying the perirenal fat in the pig. *XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000, p. 23*

II.7.5. Franke-Radowiecka A, Czaja K, Klimczuk M, Kraeling RR, Łakomy M. Distribution of neurons supplying the subcutaneous fat in the pig. *XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000, p. 16*

II.7.6. Klimczuk M, Czaja K, **Franke-Radowiecka A**, Łakomy M, Kraeling RR. Dystrybucja neuronów zaopatrujących okołonerkową tkankę tłuszczową u świni. *XI Kongres PTNW, Lublin, 21-23.IX.2000, p. 60*

II.7.7. Franke-Radowiecka A, Czaja K, Klimczuk M, Kraeling RR, Łakomy M. Dystrybucja neuronów zaopatrujących podskórną tkankę tłuszczową u świni. *XI Kongres PTNW, Lublin, 21-23.IX.2000, p. 44*

II.7.8. Franke-Radowiecka A, Majewski M, Kaleczyc J, Klimczuk M, Łakomy M, Scheuermann DW, Timmermans JP. Distribution and neurochemical coding of PACAP-immunoreactive (PACAP-IR) neurons involved in the neural circuits controlling the ileum and celiac-superior mesenteric ganglion complex (CSMG) in the pig. *Anatomische Gesellschaft-96. Versammlung, Münster, 23-26.III.2001*

II.7.9. Costagliola A, Majewski M, **Franke-Radowiecka A**, Cecio A, Timmermans JP. PACAP and its co-markers in the neural structures controlling the chicken oviduct. *Anatomische Gesellschaft-96. Versammlung, Münster, 23-26.III.2001*

II.7.10. Franke-Radowiecka A, Distribution and immunohistochemical characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) neurons supplying the porcine mammary gland. *Kongres PTA Wrocław 24.-26 VI 2001*

II.7.11. Klimczuk M, Czaja K, Franke-Radowiecka A, Kraeling R, Łakomy M. Leptine receptors (Ob-R) in neurons of the Sympathetic Chain (SChG) and Prevertebral Ganglia (PV) innervating perirenal fat tissue in the pig. *Kongres PTA, Wrocław 24-26 VI 2001*

II.7.12. Kaleczyc J, **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Pidsudko Z, Sienkiewicz W, Łakomy M. Distribution and immunohistochemical characteristics of caudal mesenteric ganglion neurons projecting to the porcine ileum. *The 38th International Symposium „Progress in basic, applied and diagnostic histochemistry” Bratislava, Slovakia, 26-27.IX 2001 Histochem J 33: 478-479.*

II.7.13. Franke-Radowiecka A. Distribution and immunohistochemical characterisation of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine mammary gland. *XII International Congress of European Neuropeptide Club, Mierki, 22-25 May 2002, Annals of Anatomy, 185: 242-243. Neuropeptides 36: 485, 2002.*

II. 7.14. Franke-Radowiecka A. Distribution and chemical coding of dorsal root ganglia (DRG) neurons supplying the porcine last abdominal mamma. *XII International Congress of European Neuropeptide Club, Mierki, 22-25 May 2002, Annals of Anatomy, 185: 242-243.*

II.7.15. Pidsudko Z, Kaleczyc J, Czaja K, Sienkiewicz W, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Timmermans JP, Łakomy M. The distribution and chemical coding of nerve fibres and neurons in the coeliac/superior mesenteric ganglion complex (CSMG) projecting to the ileum and nerve fibres in the ileum wall after chemically induced inflammation. *98 Versammlung Anatomische Gesellschaft, Dresden (Niemcy), 28-31.03.2003, Ann. Anat 185:302-303, 2003*

Po uzyskaniu stopnia doktora

II.7.16. Franke-Radowiecka A. Vasoactive intestinal Polypeptide (VIP)- immunoreactive nerve fibres in the mammary gland of the pig. *XX Congress of the Polish Anatomical Society, Lublin 4-6. IX. 2003, p. 59*

II.7.17. Franke-Radowiecka A, Całka J, Wąsowicz K, Podlasz P, Kaleczyc J., The study on the NADPHd-positive innervation of the porcine mammary gland. *22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Olsztyn 15-18 IX. 2004, p. 87*

II.7.18. Kaleczyc J, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Łakomy M. Expression of biologically active substances by intramural neurons supplying the stomach in pigs undergoing dysentery. *22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Olsztyn 15-18 IX. 2004, p. 112*

II.7.19. Kaleczyc J, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Łakomy M. The distribution and chemical coding of intramural nerve structures supplying the porcine stomach. *XXV Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Oslo 28-31.VII. 2004, p. 102*

II.7.20. Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Majewski M, Łakomy M. Changes In the expression of biologically active substances by intramural neurons supplying the gastrointestinal tract In pigs undergoing swine dysentery. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Leipzig, 11-14.03.2005, p. 116.*

II.7.21. Kaleczyc J, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M. The chemical coding of intramural neurons supplying the stomach in pigs suffering from swine dysentery. *XXI Congress of Polish Anatomical Society, Kielce, 23-25.06.2005r. p. 58.*

II.7.22. Kaleczyc J, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Całka J, Łakomy M. Distribution and chemical coding of neurons in the trunk of the porcine vagus nerve. *XXVI Congress of the European Association of Veterinary Anatomists 19-22 July, Messina (Italy) 2006, Italian Journal of Anatomy and Embryology, 111:156*

II.7.23. Całka J, Załęcki M, Wąsowicz K, **Franke-Radowiecka A**, Łakomy M. Dystrybucja i morfologia NOS-pozytywnych neuronów występujących na terenie rdzenia kręgowego świni w odcinku piersiowym, lędźwiowym i krzyżowym. *XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki, 14-15.09.2006r., str.22*

II.7.24. **Franke-Radowiecka A**, Całka J, Załęcki M, Łakomy M. Dystrybucja i morfologia CGRP-IR neuronów rdzenia kręgowego świni w odcinku piersiowym, lędźwiowym i krzyżowym. *XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki, 14-15.09.2006r., str.32*

II.7.25. **Franke-Radowiecka A**, Załęcki M, Klimczuk M, Dudek A, Kaleczyc J. Innervation of the mammary gland in the beaver (Castor fiber). Preliminary study *21th Annual Meeting of the Israel-Society-for-Neuroscience/ 1th Binational Australian-Israeli Meeting on Neuroscience; Eilat, Israel 2012.12.15, Journal of Molecular Neurosciences 2013:51(Suppl.1), S167-S168*

II.7.26. **Franke-Radowiecka A**, Załęcki M, Klimczuk M, Dudek A, Kaleczyc J. Innervation of the mammary gland in the beaver (Castor fiber). Preliminary study. *X Congress European Neuropeptide Club, Polska, Gdynia, 29.05-01.06. 2013, str. 91-92 Journal of Molecular Neuroscience (IF 2,757;20pkt)*

II.7.27. Klimczuk M, Pidsudko Z, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Kaleczyc J. Immunohistochemical characterisation of nerve fibres supplying the mandibular, sublingual and parotid gland in the beaver (Castor fiber). *X Congress European Neuropeptide Club, Polska, Gdynia, 29.05-01.06. VI, 2013, str. 95-96 Journal of Molecular Neuroscience (IF 2,757 20pkt)*

II.7.28. Załęcki M, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Dudek A, Kaleczyc J Ascending duodenal nerve projections supplying the pyloric sphincter in the pig – preliminary studies. *International Conference Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humas, Polska, Lublin, 19-20.IX.2014, materiały zjazdowe str. 48*

II.7.29. Pidsudko Z, Podgórski Ł, Wąsowicz K, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Kaleczyc J. Distribution and chemical coding of nerve fibers lying in parasympathetic nucleus of the sacral segments of the spinal cord supplying the urinary bladder of the pig. *International Conference Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humas, Polska, Lublin, 19-20.IX.2014, materiały zjazdowe str. 51*

- II.7.30. Franke-Radowiecka A**, Podlasz P, Załęcki M, Klimczuk M, Dudek A, Kaleczyc J. Comparison of different Dil tracer solvents in quality of neuronal tracing experiments – preliminary study. *International Conference Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humas, Polska, Lublin, 19-20.IX.2014, materiały zjazdowe str. 52*
- II.7.31.** Dudek A, Sienkiewicz W, Pidsudko Z, **Franke-Radowiecka A**, Tomaszewska O, Kaleczyc J. The distribution of trapezius muscle-projecting autonomic neurons in the pig. *International Conference Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humas, Polska, Lublin, 19-20.IX.2014, materiały zjazdowe str. 55*
- II.7.32.** Dudek A, Sienkiewicz W, **Franke-Radowiecka A**, Tomaszewska O, Klimczuk M, Podlasz P, Kaleczyc J. Distribution and primary sensory neurons innervating the belly and tendon of the gastrocnemius muscle in the rat – preliminary data. *XXXth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists, Rumunia, Cluj-Napoca, 23-26.VII.2014, Anat Histol Embriol 43 (Suppl. 1): 40*
- II.7.33.** Dudek A, Sienkiewicz W, Kaleczyc J, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Pidsudko Z. The plasticity of sensory neurons of the skeletal muscle after bupivacaine administration in pigs pre-treated with dexamethasone or simvastatin. *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 86*
- II.7.34.** Ejdys R, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W. VIP-immunoreactive nerve fibres and VIP receptors expression in human parotid gland affected by pleomorphic adenoma and Warthin tumor. *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 122*
- II.7.35. Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Załęcki m, Podlasz P, Pidsudko Z, Dudek A, kaleczyc J. Noradrenergic and cholinergic structures in sympathetic chain ganglia (SChG) of the ten-week-old pig fetuses. *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 83*
- II.7.36.** Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Pidsudko Z, Tkocz E, Kaleczyc J. Adrenergic and cholinergic neurons in the anterior pelvic ganglion of ten-week-old male pig fetuses *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 82*
- II.7.37.** Pidsudko Z, Podgórski Ł, Ody M, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Dudek A, Kaleczyc J. Distribution and chemical coding of nerve fibers in Onuf's nucleus of the sacral segments of the spinal cord in the pig. *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 84*
- II.7.38.** Załęcki M, Ciemiecka M, Czyż W, Lubińska A, **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Kaleczyc J. Changes in expression of CGRP, Gal and nNOS in sensory perikarya of nodose ganglia during experimentally induced gastric ulcerations in pigs – preliminary study. *XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Warszawa, 25-27.VI.2015, materiały zjazdowe str. 138*
- II.7.39.** Załęcki M, **Franke-Radowiecka A**, Pidsudko Z, Wojtkiewicz JA, Kaleczyc J. Does gastric ulcer induce changes in the expression of Substance P and its reception in the neighboring

stomach tissues including enteric nerve structures? *International Regulatory Peptide Society, Rouen, France, 2016.07. 12-16, materiały zjazdowe s. 256*

II.7.40. Zmijewska N, Zubkiewicz T, **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Kaleczyc J. Nerve structures on the base of the heart and their immunohistochemical characterization in porcine fetuses. *XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Polska, Lublin, 22-24. IX.2016, materiały zjazdowe str. 50.*

II.7.41. **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Sienkiewicz W, Pidsudko Z, Dudek A, Załęcki M, Kaleczyc J. Immunohistochemical characterization of sympathetic chain ganglia neurons in the pig fetuses. *XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Polska, Lublin, 22-24. IX.2016, materiały zjazdowe str. 54.*

II.7.42. Klimczuk M, Sienkiewicz W, **Franke-Radowiecka A**, Pidsudko Z, Podeszewski B, Kaleczyc J. Immunohistochemical characteristics of neurons of trigeminal nerve ganglion in pig fetuses. *XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Polska, Lublin, 22-24. IX.2016, materiały zjazdowe str. 55.*

II.7.43. **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Załęcki M, Klimczuk M, Dudek A, Pidsudko Z, Kaleczyc J. Immunohistochemiczna charakterystyka narządów układu rozrodczego żeńskiego u płodów świni domowej. *XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Katowice, 22-24.VI.2017, materiały zjazdowe str. 155.*

II.7.44. Pidsudko Z, Listowska Ż, Klimczuk M, **Franke-Radowiecka A**, Sienkiewicz W, Załęcki M, Kaleczyc J. Immunohistochemiczna charakterystyka neuronów zwoju kręgowego tylnego CaMG zaopatrujących pęcherz moczowy samca świni domowej immunoreaktywnych dla peptydu CART. *XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Katowice, 22-24.VI.2017, materiały zjazdowe str. 153.*

II.7.45. Dudek A, Sienkiewicz W, Kaleczyc J, **Franke-Radowiecka A**, Klimczuk M, Malina M. Plastyczność neuronów czuciowych zaopatrujących mięsień najdłuższy grzbietu świni 24 godziny po podaniu bupiwakainy u zwierząt leczonych simwastatyną lub deksametazonem. *XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polska, Katowice, 22-24.VI.2017, materiały zjazdowe str. 156.*

8. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

Czynnie uczestniczyłam w organizacji czterech zagranicznych i jednego polskiego Kongresu naukowego, organizowanych przez Katedrę Anatomii Zwierząt. Oficjalnie przypisaną funkcję mam tylko w jednym z nich.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

- Anatomische Gesellschaft - 92. Versammlung and Polish Anatomical Society, Olsztyn, 24-27.05.1997
- XXIII Congress EAVA, Olsztyn, 16-19 July 2000

- XII Międzynarodowy Kongres European Neuropeptide Club, Mierki, 22-25 May 2002

Po uzyskaniu stopnia doktora

- XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki, 14-15.09.2006
- X Congress European Neuropeptide Club, Polska, Gdynia, 29.05-01.06. VI, 2013, (członek komitetu organizacyjnego)

9. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionych funkcjach w ramach prac zespołu.

- Grant promotorski Nr 3 PO6K 014 22 “Immunohistochemiczny charakter neuronów zaopatrujących gruczoł mlekowy świni” 02.02.2001-03.12.2003 **główny wykonawca**, projekt zrealizowany, został oceniony przez Zespół Nauk Rolniczych i Leśnych Komitetu Badań naukowych na ocenę *bardzo dobrą*

10. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach

II.10.1. Polskie Towarzystwo Anatomiczne – **członek** od 1998r – do chwili obecnej

II.10.2. Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych – **członek** od 2005r – do chwili obecnej

- Od 2010 roku do dnia dzisiejszego (czwarta kadencja) -
Sekretarza Olsztyńskiego Oddziału PTNW

11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

II.11.1. Belgia, 01.04-30.06.1999 (trzy miesiące), staż naukowo-dydaktyczny, Laboratory of Cell Biology and Histology, University of Antwerp (RUCA), Prof. Dietrich W. Sheuermann

II.11.2. Belgia, 06.09-06.12.2000 (trzy miesiące), staż naukowo-badawczy, Laboratory of Cell Biology and Histology, University of Antwerp (RUCA), Prof. Jean-Pierre Timmermans

Po uzyskaniu stopnia doktora

II.11.3. USA, 11.04-01.05.2012 (trzy tygodnie), staż dydaktyczny, ProEDU, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology, Washington State University, Pulman, Prof. Steve M. Simasko, Ph.D

12. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej itp.)

13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych

- Journal of Neuroscience Methods – IF 2.053, praca w 2015 roku
- Journal of Morphology – IF 1.804, praca w 2021 roku

14. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

- „Framework of the bilateral cultural cooperation programme between the Flemish Community and Poland”, **stypendystka**, 2000r

15. Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt.II.9.

- KNOW - Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący - Konsorcjum Naukowego “Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność” (2015 – 2019 r.), beneficjent.
- RID - Regionalna Inicjatywa Doskonałości "Innowacyjna żywność wysokiej jakości dla zdrowia społeczeństwa i zrównoważonego rozwoju – zintegrowany program rozwoju badań naukowych i innowacji w zakresie nauk rolniczych i nauk weterynaryjnych na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie". Projekt finansowany w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pod nazwą "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019 - 2022, beneficjent.

16. Informacje o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznawanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny

III. INFORMACJA O WSPÓŁPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym.

3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe.

4. Informacja o wdrożonych technologiach.

5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub* przedsiębiorców.

7. Informacja o projektach artystycznych realizowana ze środowiskami pozaartystycznymi.

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	IF*	Liczba**
Prace oryginalne z listy ICR (lista „A”) MNiSW 2019 MEiN 2021	21	25,691	590
Prace oryginalne z listy ICR (lista „A”) MNiSW 2019 wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym	3	5,899	280
Prace przeglądowe z listy ICR MEiN 2021	1	0,383	20
Ogółem	25	31,973	890

*Współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) podano według roku publikacji

**Punktację MNiSW podano zgodnie z rokiem publikacji

Punktację MEiN dla publikacji, które ukazały się w 2021r podano zgodnie z rokiem publikacji

2. Informacja o liczbie cytowań publikacji, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań

Liczba cytowani według bazy Web of Science Core Collection - **111**, bez autocytowań - **77**

Liczba cytowani według bazy SCOPUS - **141**, bez autocytowań - **107**

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha

Współczynnik Hirscha według bazy Web of Science Core Collection - **6**

Współczynnik Hirscha według bazy SCOPUS – **8**

Amelia Franke-Radowiecka

.....
(podpis wnioskodawcy)