



SCP/4008/2023
ID: 17900300013242

Rada Naukowa Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. M. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn



RPW/5970/2023
Data: 2023-06-26

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Natalia Ziółkowska
Katedra Histologii i Embriologii,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wniosek

z dnia 20.06.2023

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora **habilitowanego w dziedzinie Nauk Weterynaryjnych** w dyscyplinie **Weterynaria**.

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

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Wpływ monochromatycznego światła niebieskiego na morfologię siatkówki, w szczególności na komórki zwojowe zawierające melanopsynę oraz na ekspresję wybranych genów związanych z fotorecepcją i degeneracją siatkówki u szczurów pigmentowanych i albinotycznych”

Wnoszę – 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***¹

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) Rozporządzenia UE 2016/679 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 przeprowadzenia 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

Ziolkowska Natalia

(podpis wnioskodawcy)

¹ * Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia Dyplomu Doktorskiego
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
5. Deklaracje współautorów wskazujące na ich wkład w cykl powiązanych tematycznie artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
6. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego
7. Kopie dokumentów potwierdzających kierownictwo lub udział w grantach
8. Kopie dokumentów potwierdzających staże w zagranicznych jednostkach naukowych
9. Kopie dokumentów potwierdzających współpracę naukową
10. Kopie dokumentów potwierdzających otrzymanie nagród naukowych

Autoreferat

dr n. wet. Natalia Ziółkowska

Katedra Histologii i Embriologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2023

1. Imię i nazwisko

Natalia Ziółkowska

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

- 18.06.2015**
- Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie histologii,
 - Promotor: prof. dr hab. Bogdan Lewczuk,
 - Recenzenci pracy doktorskiej: prof. dr hab. Barbara Przybylska-Gornowicz oraz prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta,
 - Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Badania nad biosyntezą melatoniny i mechanizmami jej regulacji w szyszynce gęsi domowej”*,

Jednostka nadająca stopień naukowy: Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Jednostka nadająca tytuł lekarza weterynarii:

- 06.04.2009** Wydział i Uczelnia: Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

1.10.2015 do chwili obecnej	<ul style="list-style-type: none">• Stanowisko: adiunkt w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.
14.02.2018 - 15.08.2018	<ul style="list-style-type: none">• Stanowisko: postdoctoral scholar w Division of Experimental Retinal Therapies, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, USA.
01.10.2009- 30.09.20015	<ul style="list-style-type: none">• Stanowisko: doktorant w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane

osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4. 1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Wpływ monochromatycznego światła niebieskiego na morfologię siatkówki, w szczególności na komórki zwojowe zawierające melanopsynę oraz na ekspresję wybranych genów związanych z fotorecepcją i degeneracją siatkówki u szczurów pigmentowanych i albinotycznych”

Cykl obejmuje 3 oryginalne artykuły naukowe opublikowane w latach 2022 – 2023 w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR). Wartości ważniejszych parametrów bibliometrycznych zgłaszanego osiągnięcia wynoszą:

- łączna liczba punktów MEiN (według wykazu listy czasopism punktowanych MEiN z dn. 9 lutego 2021 r.) to **380 pkt**
- łączny współczynnik oddziaływania [Impact factor (IF)] na dzień składania wniosku to **16,12**

4. 2. Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

4. 2. 1. Natalia Ziółkowska*, Małgorzata Chmielewska-Krzysińska, Alla Vyniarska, Waldemar Sienkiewicz. *Exposure to blue light reduces melanopsin expression in intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells and damages the inner retina in rats.* Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2022; 63(1): 1-11.

Punktacja MEiN = 140; IF₂₀₂₁ = 4,925

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 85%

4. 2. 2. Natalia Ziółkowska*, Bogdan Lewczuk. *Profiles of Rho, Opn4, c-Fos, and Birc5 mRNA expression in Wistar rat retinas exposed to white or monochromatic light.* Frontiers in Neuroanatomy. 2022; 16: 956000.

Punktacja MEiN = 100; IF₂₀₂₁ = 3,543

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 90%.

4. 2. 3. Natalia Ziółkowska*, Bogdan Lewczuk, Natalia Szyryńska, Aleksandra Rawicka, Alla Vyniarska. *Low-intensity blue-light exposure reduces melanopsin expression in intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells and damages mitochondria in retinal ganglion cells in Wistar rats.* Cells. 2023; 12(7): 1014.

Punktacja MEiN = 140, IF₂₀₂₁ = 7,666

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 75%.

***autor korespondencyjny**

Badania w części zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego pt. „Analiza morfologiczna wpływu światła niebieskiego o wysokiej energii (HEV) na siatkówkę oka szczurów” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (**kierownik projektu** w ramach projektu Miniatura 1).

4.2. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.2.1. Wprowadzenie i cel badań

W ostatnich latach problem negatywnego wpływu światła niebieskiego na siatkówkę oka budzi duże zainteresowanie ze względu na powszechne i stale wzrastające użytkowanie urządzeń zawierających diody emitujące światło (LED) tj. smartfonów, tabletów, monitorów i telewizorów z wyświetlaczami ciekłokrystalicznymi (LCD), jak również stosowanie LED do oświetlenia pomieszczeń. W celu uzyskania światła białego wykorzystywana jest dioda emitująca światło niebieskie o długości fali 450-470 nm, które wywołuje zjawisko elektroluminescencji. Wysoka energia światła niebieskiego pobudza luminofor, który pod jego wpływem emituje światło żółte i zielone. Zatem, białe oświetlenie LED jest mieszaniną światła o różnej długości fali, z istotną komponentą światła niebieskiego, którego energia ze względu na najkrótszą długość fali jest największa w całym jego spektrum (Ham i in., 1976). Pomimo faktu, że monochromatyczne światło niebieskie może być stosowane w leczeniu zaburzeń snu i w regulacji procesów fizjologicznych zachodzących w rytmie dobowym (Li i in., 2022), to nadmierna ekspozycja na nie może powodować szereg zaburzeń fizjologicznych, takich jak bezsenność, suchość oka, a nawet ślepotę wywołaną uszkodzeniem siatkówki (Grimm i in., 2001; Iandiev i in., 2008; Roehlecke i in., 2011; Kuse i in., 2014; Shang i in., 2014, 2017; Krigel i in., 2016; Ratnayake i in., 2020).

Siatkówka oka, odpowiedzialna za wizualną i niewizualną percepcję, jest strukturą światłoczułą zbudowaną z kilku warstw neuronów i z komórek glejowych (Güler i in., 2008; Schmidt i in., 2014). Funkcje wzrokowe pełni dzięki fotoreceptorom i zawartym w nich ftopigmentom: rodopsynie (obecnej w komórkach pręcikowych) i opsynom (obecnym w komórkach czopkowych). Komórki pręcikowe odpowiedzialne są za widzenie w warunkach słabego oświetlenia (tzw. widzenie skotopowe), natomiast komórki czopkowe odpowiedzialne są za ostrość widzenia i percepcję kolorów. W badaniach prowadzonych na gryzoniach wykazano, że ekspozycja na światło niebieskie lub na białe światło LED o dużym natężeniu, prowadzi do degeneracji siatkówki poprzedzonej jej bliznowaceniem i śmiercią fotoreceptorów (Grimm i in., 2001; Iandiev i in., 2008; Roehlecke i in., 2011; Jaadane i in., 2020). Ponadto, stwierdzono, że kluczową rolę w mechanizmie uszkadzającego wpływu światła na komórki pręcikowe odgrywa rodopsyna (Grimm i in., 2001). W siatkówce gryzoni pod wpływem światła niebieskiego dochodzi do szybszej regeneracji rodopsyny z formy „trans” do formy aktywnej „cis”, a co za tym idzie, do szybszej zdolności wychwytywania dużej ilości fotonów przez ten barwnik, co w konsekwencji prowadzi do fotochemicznego uszkodzenia siatkówki (Grimm i in., 2001). Dotychczas nie określono dokładnego mechanizmu uszkodzenia komórek czopkowych i innych neuronów w siatkówce pod wpływem światła, ale wykazano, że uszkodzenia te mogą być również zależne od absorpcji światła przez rodopsynę (Samardzija i in., 2019). Niektóre badania sugerują, że uszkodzenie komórek czopkowych może być efektem bliznowacenia (glejozy) i remodelingu siatkówki, które towarzyszą jej uszkodzeniu fotochemicznemu (Garcia-Ayuso i in., 2019). Badania ostatnich lat wykazały także, że ekspozycja szczurów na światło niebieskie o dużo mniejszym natężeniu wywołuje już apoptozę fotoreceptorów (Shang i in., 2017). Niemniej jednak, do tej pory nie określono szczegółowo, jaki jest wpływ światła niebieskiego o niskim natężeniu na komórki światłoczułe siatkówki.

Na uwagę zasługuje fakt, że dotychczasowe badania nad negatywnym wpływem światła niebieskiego na fotoreceptory siatkówki prowadzono głównie u szczurów albinotycznych. Z kolei coraz więcej dowodów wskazuje, że uszkodzenia spowodowane światłem mogą różnić się znacząco pomiędzy szczurami albinotycznymi i niealbinotycznymi (Hannibal i in., 2013). Krigel i in. (2016) wykazali, że ekspozycja szczurów albinotycznych i szczurów pigmentowanych na białe światło LED (500 lux) przez 24 h wywoływała uszkodzenia tylko u tych pierwszych, sugerując, że obecność barwnika w oku może mieć działanie ochronne. Ten fakt rodzi pytanie o wrażliwość osobników niealbinotycznych na uszkodzenia fotochemiczne spowodowane światłem niebieskim, co zostało podjęte w niniejszych badaniach.

Komórki czopkowe i pręcikowe uznawane były za jedyne komórki światłoczułe siatkówki kręgowców przez ponad 150 lat, aż do odkrycia małej subpopulacji komórek

zwojowych połączonych szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym z jądrem nadskrzyżowaniowym w mózgowiu (Hattar i in., 2002; Berson, 2003). Komórki te nazwano światłoczułymi komórkami zwojowymi - ipRGCs (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells). Dopiero kilka lat później odkryto, że fotopigmentem w tych komórkach jest melanopsyna, będąca błonowym receptorem, o budowie zbliżonej do rodopsyny (zawiera chromofor i *cis*-retinal), zlokalizowanym w błonie perikarionów oraz dendrytów ipRGC (Provencio, 1998, Berson, 2002). Melanopsyna wykazuje maksymalną wrażliwość na światło niebieskie w zakresie długości fali 470-480 nm (Qi i in., 2005), dlatego nadmierna ekspozycja siatkówki na to światło może wpływać negatywnie nie tylko na klasyczne fotoreceptory, ale również na ipRGCs, co dotychczas było badane sporadycznie (Benedetto i in., 2017; Garcia - Ayuso i in., 2017). Uszkodzające działanie światła niebieskiego na ipRGCs może mieć również związek z faktem, że ich aksony w większości pozbawione są osłonki mielinowej i posiadają dużą liczbę mitochondriów (Bristov i in., 2002; Belenky i in., 2003), a enzymy w nich zawarte pod wpływem światła niebieskiego mogą prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu, negatywnie wpływających na transport aksonalny i żywotność ipRGCs (Chen i in., 2002; Osborne i in., 2008; Garcia-Ayuso i in., 2019).

Morfologicznie, ipRGCs wykazują duże zróżnicowanie i ze względu na sposób i gęstość rozgałęzienia dendrytów oraz na wielkość perikarionu, wyróżniono kilka podtypów tych komórek (Berson i in., 2002; Sondereker i in., 2017; Aranda i Schmidt, 2021; Mure i in., 2021). Z kolei funkcjonalnie, ipRGCs działają z jednej strony jak typowe fotoreceptory, reagując na bodźce świetlne o niskim natężeniu, a z drugiej strony jak typowe neurony odbierające i integrujące impulsy z innych neuronów siatkówki, przesyłając je szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym do wybranych ośrodków w mózgu (Berson i in., 2003; Pickard i in., 2009). IpRGCs różnią się funkcjonalnie od klasycznych fotoreceptorów m.in. w odpowiedzi na bodziec świetlny, kiedy ich błona ulega depolaryzacji, podczas gdy w komórkach czopkowych i pręcikowych hiperpolaryzacji. Ponadto, ipRGCs znacznie wolniej reagują na pobudzenie wywołane światłem w porównaniu z klasycznymi fotoreceptorami, co przejawia się wydłużonym czasem odpowiedzi na ten bodziec (60 sekund vs 60 pikosekund w komórkach pręcikowych). W wyniku pobudzenia ipRGCs impuls przez aksony tych komórek opuszcza gałkę oczną i informacja dociera do jądra nadskrzyżowaniowego, które uznawane jest za „centralny zegar” biologiczny wyższych kręgowców (Fernandez i in., 2016). Opisano, iż w warunkach fizjologicznych, komórki ipRGCs nawiązują połączenia synaptyczne z klasycznymi fotoreceptorami (Berson i in., 2003) i dowiedziono, że ekspresja melanopsyny w ipRGCs jest częściowo od nich zależna, co sugeruje, że klasyczne fotoreceptory mogą wpływać na funkcjonowanie tych komórek (Semo i in., 2003; Wan i in., 2006). Pomimo, że ipRGCs w

siatkówce szczura stanowią zaledwie 1-3% wśród całej populacji komórek zwojowych siatkówki (Danas i in., 2002; Galindo-Romero i in., 2013), to odgrywają one bardzo istotną rolę, głównie w procesach niezwiązanych z percepcją obrazu m.in. w regulacji odruchu źrenicznego, regulacji cyklu snu i czuwania, regulacji nastroju oraz percepcji natężenia światła (Danas i in., 2002; Galindo-Romero i in., 2013).

Dotychczasowe badania nad wpływem światła LED na siatkówkę oka dotyczyły głównie jego negatywnego wpływu na klasyczne fotoreceptory, tj. komórki czopkowe i pręcikowe, a w mniejszym stopniu na ipRGCs (Iandiev i in., 2008; Shang i in., 2014; Krigel, 2016). Wykazano, że ekspozycja szczurów albinotycznych na światło białe LED zmniejszała liczbę ipRGCs w siatkówce badanych zwierząt i zmniejszała ekspresję melanopsyny w tych komórkach, wpływając jednocześnie na zmianę jej rozmieszczenia (Benedetto i in., 2017). W badaniach tych wykazano również, że obniżenie liczby ipRGCs wynikało przede wszystkim z obniżenia ekspresji melanopsyny, a nie ze śmierci tych komórek (Benedetto i in., 2017).

W związku z obniżeniem ekspresji melanopsyny w siatkówce gryzoni pod wpływem światła, rodzi się także pytanie o zmiany w ekspresji genu melanopsyny (*Opn4*). Dotychczas wykazano, że w siatkówce gryzoni ekspresja mRNA *Opn4* zależna jest od światła i wykazuje wahania dobowe, z najwyższym poziomem o zmierzchu, a najniższym o świcie (Hannibal i in., 2005, 2013). Stwierdzono również, że mutacje w genie *Opn4* mogą u ludzi prowadzić do choroby afektywnej sezonowej SAD (Roeklein i in., 2009). Pomimo, iż wykazano spadek ekspresji melanopsyny pod wpływem ekspozycji siatkówki szczurów na światło białe LED o wysokiej intensywności >1000 lux (Hannibal i in., 2005, 2013; Garcia-Ayuso, 2017), to nie określono czy koreluje to ze zmianami w ekspresji mRNA *Opn4*.

Degeneracja siatkówki indukowana światłem wiąże się nieodzownie z działaniem ważnego czynnika transkrypcyjnego, białka c-FOS, który moduluje ekspresję wielu genów, w tym genów związanych z funkcjonowaniem fotoreceptorów (Tao i in., 1993; Kumar i in., 1996; He i in., 1998). Wykazano ekspresję białka c-FOS w klasycznych fotoreceptorach i w ipRGCs pod wpływem stymulacji światłem (Nir i in., 1993; Semo i in., 2003). W warunkach fizjologicznych ekspresja mRNA *c-Fos* w siatkówce szczura jest 4-krotnie wyższa w nocy niż w dzień (Kamahis i in., 2005). Stwierdzono, że ekspresja mRNA *c-Fos* wzrasta znacząco w uszkodzeniach fotochemicznych siatkówki oraz, że ekspozycja na światło myszy pozbawionych genu *c-Fos* nie powoduje uszkodzeń siatkówki, wykazując tym samym istotną rolę białka c-FOS w apoptozie neuronów siatkówki pod wpływem tego czynnika (Hafezi i in., 1997; Grimm i in., 2000). W uszkodzonych komórkach zwojowych siatkówki (RGCs) w warunkach *in vitro*, białko c-FOS uczestniczy w procesie ich apoptozy oraz regeneracji (Oshitari i in., 2002). Dotychczasowe badania skupiały się jedynie na zmianach ekspresji *c-Fos*

w przypadku degeneracji siatkówki wywołanej światłem o dużym natężeniu, natomiast brak jest informacji dotyczącej zmian w ekspresji *c-Fos* w warunkach ekspozycji na światło monochromatyczne o niskim natężeniu.

W określonych warunkach (czas, natężenie, długość fali) światło prowadzi do obumierania fotoreceptorów siatkówki. Wiele badań morfologicznych wskazuje na to, że głównym typem śmierci komórkowej w siatkówce pod wpływem światła jest apoptoza (Hafezi i in., 1997; Grimm i in., 2001; Jaadane i in., 2015; Shang i in., 2017). W ostatnim czasie prowadzone są badania nad identyfikacją czynników o działaniu neuroprotekcijnym, które mogłyby być skuteczne w opóźnianiu obumierania neuronów zachodzącym w chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera czy też degeneracja plamki żółtej. Jednym z istotniejszych czynników o takim działaniu jest białko BIRC5, które należy do grupy protein hamujących apoptozę (IAP, inhibitor apoptosis protein) niezbędnych we wczesnym etapie rozwoju układu nerwowego, ze względu na działanie neuroprotekcyjne względem rozwijających się neuronów (Adida i in., 1998; Jiang i in., 2005). Ponieważ ekspresja BIRC5 zmienia się w niektórych chorobach degeneracyjnych siatkówki (Downs i in., 2015), zasadnym wydaje się postawienie pytania czy ekspresja tego genu o działaniu anty-apoptotycznym i neuroprotekcijnym zmienia się w odpowiedzi na działanie światła niebieskiego, które ze względu na wysoką energię jest toksyczne dla siatkówki oka.

Ze względu na fakt, iż białe światło LED stanowi obecnie dominujący typ oświetlenia i w przeciwieństwie do światła naturalnego ma w swoim spektrum znaczący udział niebieskiej komponenty o długości fali 460-470 nm, głównym celem podjętych badań było poszerzenie zakresu wiedzy na temat wpływu tego światła (o różnym natężeniu i różnym czasie ekspozycji) na siatkówkę oka, wybierając przy tym zwierzę modelowe jakim jest szczur. W celu określenia wpływu światła niebieskiego o niskim natężeniu na siatkówkę oka, wybrano model szczura albinotycznego (Wisatr). W celu określenia wpływu światła niebieskiego o wysokim natężeniu na siatkówkę oka, wybrano model szczura pigmentowanego (Brown Norway). Poszczególne zadania badawcze obejmowały:

1. Określenie wpływu światła niebieskiego LED na:
 - a) liczbę komórek zwojowych zawierających melanopsynę (ipRGCs) w siatkówce szczurów pigmentowanych Brown Norway i szczurów albinotycznych Wistar;
 - b) długość melanopsyno-pozytywnych dendrytów w siatkówce szczurów Brown Norway i szczurów albinotycznych Wistar;

- c) morfologię siatkówki, ze szczególnym uwzględnieniem komórek fotoreceptorowych u szczurów Brown Norway i szczurów albinotycznych Wistar;
 - d) ultrastrukturę fotoreceptorów i komórek zwojowych siatkówki u szczurów Brown Norway i szczurów albinotycznych Wistar;
2. Określenie wpływu światła niebieskiego na ekspresję:
- a) genów związanych z fotorecepcją, tj. genu rodopsyny (*Rho*) i genu melanopsyny (*Opn4*) u szczurów Wistar;
 - b) genu związanego z degeneracją siatkówki *c-Fos* u szczurów Wistar;
 - c) genu anty-apoptotycznego *BIRC5* u szczurów Wistar.
3. Określenie, która część widma światła widzialnego jest najbardziej foto-toksyczna względem siatkówki szczurów albinotycznych Wistar i czy jest ona warunkowana długością fali.

Powyższe cele zostały zrealizowane za pomocą:

- analizy histologicznej i ultrastrukturalnej siatkówek;
- oceny ilościowej perikarionów ipRGCs oraz długości ich dendrytów w siatkówce;
- barwienia TUNEL w celu odpowiedzi na pytanie czy ekspozycja na światło niebieskie o różnym natężeniu wywołuje apoptozę komórek fotoreceptorowych;
- badania ekspresji genów *Rho*, *Opn4*, *c-Fos* i *BIRC5* w siatkówkach szczurów eksponowanych na światło białe i monochromatyczne: czerwone, zielone i niebieskie.

4.2.2. Materiały i metody

4.2.2.1. Zwierzęta doświadczalne i układ eksperymentalny

Do doświadczeń użyto szczury ras Brown Norway (Charles River Laboratories, Niemcy) oraz Wistar (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) w wieku 3 miesięcy. Do ukończenia 3 miesiąca życia, wszystkie szczury utrzymywane były w warunkach 12 godzin światła białego i 12 godzin ciemności. Faza jasna cyklu trwała od godziny 08:00 – 20:00, a faza ciemna od godziny 20:00 – 08:00. Źródłem światła białego były lampy jarzeniowe (<100 lux). W momencie rozpoczęcia doświadczenia zwierzęta umieszczono w przejrzystych klatkach ze sztucznego tworzywa, umożliwiającym niezakłócone przenikanie światła. Wszystkie procedury eksperymentalne zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną w Połtawie (Ukraina).

Doświadczenie 1

Dwadzieścia cztery szczury rasy Brown Norway podzielono na trzy grupy. Dziewięć szczurów utrzymywano w ciągłej ciemności przez 24 godziny, a następnie - w warunkach ciągłego oświetlenia światłem niebieskim o natężeniu 1000 lux przez 2 dni (grupa ostra AE); dziewięć szczurów utrzymywano w warunkach 12 godzin światła niebieskiego (1000 lux) i 12 godzin ciemności przez 10 dni (grupa przewlekła LTE); sześć szczurów utrzymywano w warunkach 12 godzin światła białego (1000 lux) i 12 godzin ciemności przez 10 dni (grupa kontrolna). W celu eliminacji odruchu źrenicznego, zwierzętom w grupie AE aplikowano dwa razy dziennie krople rozszerzające źrenicę (Atropina 1%). Źródłem światła niebieskiego były lampy LED zawierające diody zgrupowane w formie reflektorów (463 ± 10 nm; 400 niebieskich diod na klatkę; 50 diod = 16 000 lumenów/5 m²).

Doświadczenie 2

Dwadzieścia siedem szczurów rasy Wistar podzielono na trzy grupy. Dziewięć szczurów trzymano w ciągłej ciemności przez 24 godziny, a następnie utrzymywano w warunkach ciągłego oświetlenia światłem niebieskim (150 lux) przez 2 dni (grupa ekspozycji krótkoterminowej STE); dziewięć szczurów utrzymywano w warunkach 12 godzin światła niebieskiego (150 lux) i 12 godzin ciemności przez 10 dni (grupa przewlekła LTE); dziewięć szczurów utrzymywano w warunkach 12 godzin światła białego (150 lux) i 12 godzin ciemności przez 10 dni (grupa kontrolna). W celu eliminacji odruchu źrenicznego, zwierzętom w grupie STE aplikowano dwa razy dziennie krople rozszerzające źrenicę (Tropicamid 1%). Źródłem światła niebieskiego były taśmy z diodami LED (463 ± 10 nm).

Doświadczenie 3

Sto dwadzieścia osiem szczurów rasy Wistar podzielono na cztery grupy: grupę niebieską (n=32), grupę zieloną (n=32), grupę czerwoną (n=32) i grupę kontrolną (n=32). Szczury grupy niebieskiej utrzymywano w warunkach 12 godzin światła niebieskiego (150 lux) i 12 godzin ciemności przez 7 dni; szczury grupy zielonej utrzymywano w warunkach 12 godzin światła zielonego (150 lux) i 12 godzin ciemności przez 7 dni; szczury grupy czerwonej utrzymywano w warunkach 12 godzin światła czerwonego (150 lux) i 12 godzin ciemności przez 7 dni. Szczury kontrolne utrzymywano w warunkach 12 godzin światła białego i 12 godzin ciemności. Faza jasna rozpoczynała się o godzinie 8:00. Źródłem światła niebieskiego, zielonego i czerwonego były taśmy z diodami LED (niebieskie 463 ± 10 nm; zielone 523 ± 10 nm; czerwone 623 ± 10 nm), emitujące światło o intensywności 150 lux. Źródłem światła białego dla grupy kontrolnej były lampy jarzeniowe emitujące światło o szerokim spektrum, z dyskretną częstotliwością pików. W celu pobrania siatekówek do badań zwierzęta poddano eutanazji w odstępach 3 godzinnych, o godzinie 20:00, 23:00, 02:00, 05:00, 08:00, 11:00, 14:00 i 17:00. Na każdy punkt czasowy przypadały 4 szczury. Od każdego szczura jedną gałkę oczną

przeznaczono do badań morfologicznych, a z drugiej gałki ocznej wyizolowano siatkówkę, którą przeznaczono do badań molekularnych PCR.

4.2.2.2. Badania laboratoryjne

Barwienia immunocytochemiczne

Barwienia immunocytochemiczne przeprowadzano z użyciem siatkówek pobranych od szczurów z Doświadczenia 1 i 2. Bezpośrednio po eutanazji, od zwierząt pobrano obie gałki oczne, z czego jedną przeznaczono na uzyskanie preparatu typu *whole-mount*, a drugą do pozostałych badań morfologicznych. W celu uzyskania preparatu typu *whole-mount* gałkę oczną przecięto w płaszczyźnie równikowej, 2 mm za rąbkiem rogówki, po czym delikatnie wyizolowano siatkówkę, którą utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 45 minut, a następnie płukano w buforze fosforanowym. Barwienie immunocytochemiczne przeprowadzono poprzez inkubację siatkówek z przeciwciałami pierwotnymi przeciwko melanopsynie (Abcam 19383, rozcieńczenie 1:200). Następnie, tkankę inkubowano z przeciwciałami wtórnymi (Alexa 568, rozcieńczenie 1:2000) przez 3 godziny, płukano i zatapiano w medium zawierającym DABCO i Fluoromount G (Johnson i in., 1982).

Do pozostałych barwień immunochemicznych gałki oczne utrwalano w 4% paraformaldehydzie, płukano w buforze fosforanowym, poddawano krioprotekcji w 30% sacharozie, a następnie zamrażano. Skrawki mrożeniowe o grubości 10 μm inkubowano przez 24 godziny z przeciwciałami pierwotnymi przeciwko kwaśnej glikoproteinie włókienkowej (GFAP), a następnie płukano w buforze fosforanowym i inkubowano z przeciwciałami wtórnymi (Alexa 488, rozcieńczenie 1:2000). Preparaty analizowano i fotografowano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.

Barwienie na apoptozę

W celu wykrycia apoptozy w neuronach siatkówki przeprowadzono barwienie TUNEL z użyciem kitu In Situ Cell Death Diagnostic Kit (Roche, Niemcy). Osiem skrawków mrożeniowych z każdej przeznaczonej do tego badania siatkówki poddano barwieniu zgodnie z wytycznymi producenta. TUNEL-pozytywne komórki liczono manualnie na skrawku siatkówki odlegości 1000 μm (Doświadczenie 1) lub 2000 μm (Doświadczenie 2).

Badania ultrastrukturalne

Do badań ultrastrukturalnych pobrano dogrzebietową część siatkówki wraz z przylegającą naczyniówką i twardówką. Fragmenty tkanek utrwalono w mieszaninie 1% paraformaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w 0,2 M buforze fosforanowym (pH 7,4). Następnie, tkanki płukano, utrwalano w 2% czterotlenku osmu (2 h) i zatapiano w żywicy Epon 812. Półcienkie skrawki barwiono błękitem toluidyny i analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Skrawki ultracienkie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a

następnie badano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai 12 Spirit G2 BioTwin (TEM, FEI, USA). Pięć do siedmiu skrawków każdej siatkówki badano przy użyciu TEM.

4.2.2.3. Analiza ilościowa perikarionów ipRGCs oraz ocena długości melanopsyno-pozytywnych wypustek ipRGCs

Melanopsyno-pozytywne perikariony liczono manualnie w preparatach siatkówki typu *whole-mount* przy użyciu programu ImageJ 1.51n (Schindelin i in., 2012). W celu określenia długości melanopsyno-pozytywnych wypustek ipRGCs, wykonano 4 zdjęcia z obszaru skroniowego siatkówki i 4 zdjęcia z obszaru nosowego siatkówki, które następnie złożono w 2 zdjęcia kompozytowe o łącznym obszarze 2,56 mm każde. Długość melanopsyno-pozytywnych wypustek nerwowych liczono manualnie przy pomocy NeuronJ w programie ImageJ (1,51n). Długość wszystkich melanopsyno-pozytywnych włókien w obszarze 2,56 mm² została następnie zsumowana i wyrażona w mm.

4.2.2.4. Pomiar gęstości drzewa dendrytycznego ipRGCs – analiza Sholla

Do analizy gęstości drzewa dendrytycznego ipRGCs w grupie kontrolnej i w grupach eksponowanych na światło niebieskie (Doświadczenie 2), użyto zdjęć o wymiarze 2,56mm² (zdjęcia wcześniej użyto do pomiaru długości melanopsyno-pozytywnych wypustek ipRGCs podrozdział 4.2.2.3.), w których obrębie wytypowano od 10-25 perikarionów ipRGCs. Liczba perikarionów ipRGCs użytych do tej analizy różniła się pomiędzy grupami ze względu na wpływ warunków eksperymentalnych na ich liczbę. Analiza polegała na nałożeniu koncentrycznych pierścieni rozmieszczonych co 10 µm wokół centralnego punktu, którym był perikarion ipRGCs. Następnie, liczbę przecięć dendrytów ipRGCs w obrębie każdego pierścienia liczono automatycznie z użyciem analizy Sholl w programie ImageJ.

4.2.2.5. Badania molekularne – qPCR

Fragmenty siatkówek do badań PCR utrwalono w RNAlater (Invitrogen, USA) i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania oznaczeń. Całkowite RNA z siatkówek izolowano przy użyciu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Eurx, Polska). Ocenę jakości i koncentracji całkowitego RNA badano za pomocą NanoVue Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA). Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Całkowita zawartość RNA w jednej próbce wynosiła 0,5µg/20µL próbki. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze Biometra Thermocycler (Biometra T Gradient Professional Basic) według schematu: 5 min w 25°C, 60 min w 42°C, 5 min w 85°C, oraz 10 min w 4°C. Następnie wszystkie próbki zamrożono w temperaturze -80°C.

Produkty odwrotnej transkrypcji (RT) rozcieńczono w proporcji 1:2 z wodą wolną od RNA i DNA. Każda próbka reakcyjna (20 μ L) PCR zawierała: 1 μ L produktu RT, 10 μ L SYBR® Select Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA), 1 μ L mieszaniny starterów (5 μ M każdy) i 8 μ L wody wolnej od nukleaz. Relatywną ekspresję 4 genów w każdej próbce badano w 3 powtórzeniach na 96-dołkowej płytce. Jako genu referencyjnego użyto dehydrogenazę fosforanu aldehydu glicerynowego (GAPDH), którego stabilność ekspresji została wcześniej potwierdzona. Za kontrolę negatywną służyła próbka z mieszaniną pozbawioną produktów RT. Próby PCR inkubowano w 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) przez 10 min w 95°C, następnie 40 cykli w 95°C przez 15 s oraz w 60°C przez 1 min. Wartość graniczną dla każdego genu skonfigurowano automatycznie powyżej linii bazowej w punkcie amplifikacji. Relatywna ekspresja dla każdego genu została obliczona z użyciem porównawczych metod CT (Schmittgen i Livak 2008).

4.2.3. Wyniki

4.2.3.1. Badania nad wpływem światła niebieskiego o wysokim natężeniu (1000 lux) na siatkówkę oka u szczurów pigmentowanych. Doświadczenie 1.

4.2.3.1.1. Wpływ światła niebieskiego o wysokim natężeniu (1000 lux) na liczbę perikarionów ipRGCs, średnią długość ich dendrytów i rozmieszczenie melanopsyny w siatkówce szczurów pigmentowanych.

Liczba melanopsyno-pozytywnych perikarionów w preparatach siatkówki była znacząco mniejsza w obu grupach zwierząt eksponowanych na światło niebieskie. Liczba perikarionów była istotnie mniejsza w grupie AE w porównaniu z grupą LTE, natomiast w grupie LTE istotnie niższa niż w grupie kontrolnej.

Rozmieszczenie melanopsyny w ipRGCs było podobne w grupie LTE i kontrolnej, natomiast różniło się znacząco w grupie AE. W grupie LTE i kontrolnej melanopsyna obecna była w perikarionach i w gęstej sieci dendrytów ipRGCs, również w tych, położonych najbardziej dystalnie w stosunku do perikarionów. Immunoreaktywność w grupie AE była znacznie mniejsza niż w pozostałych grupach i często ograniczała się do perikarionów oraz proksymalnych części dendrytów, znajdujących się blisko ciała neuronu. Melanopsyno-immunoreaktywne „żyłakowatości” obecne były w wypustkach ipRGCs obu grup eksponowanych na działanie światła niebieskiego, jednakże były one znacznie mniejsze i występowały rzadziej w siatkówkach zwierząt z grupy AE.

Ostra ekspozycja na światło niebieskie powodowała zmniejszenie całkowitej długości melanopsyno-pozytywnych wypustek nerwowych. Długość melanopsyno-pozytywnych wypustek była istotnie mniejsza w grupie AE niż w grupie LTE i kontrolnej. Średnia długość wypustek w grupie LTE była porównywalna ze średnią długością wypustek grupy kontrolnej.

4.2.3.1.2. Wpływ światła niebieskiego o wysokim natężeniu (1000 lux) na morfologię siatkówki u szczurów pigmentowanych – analiza histologiczna i ultrastrukturalna.

Wyniki przeprowadzonych badań histologicznych wykazały znaczne uszkodzenia siatkówek szczurów grupy AE i brak zmian w siatkówkach szczurów grupy kontrolnej i LTE. Badania histologiczne wykazały prawie całkowity zanik warstwy jądrzastej zewnętrznej (ONL) w siatkówkach grupy AE. W warstwie tej wykryto niewiele jąder, a wśród nich, występowały jądra wykazujące cechy apoptozy, tj. kondensację chromatyny i jej marginalizację. Pomimo, że w grupie AE, segmenty wewnętrzne i zewnętrzne fotoreceptorów były obecne, to w porównaniu do grupy kontrolnej były one mniej liczne i skrócone. W grupie kontrolnej i LTE segmenty fotoreceptorów prezentowały prawidłową morfologię. W siatkówkach szczurów grupy AE warstwa spłotowata wewnętrzna (IPL), zawierająca wypustki komórek zwojowych, dwubiegunowych i horyzontalnych, oraz warstwa włókien nerwu wzrokowego (NFL) były znacznie grubsze i zwakuolizowane w porównaniu z grupą kontrolną i LTE. W grupie AE niektóre komórki warstwy ONL wykazywały cechy apoptozy, takie jak kondensację chromatyny i jej marginalizację.

Badania ultraskrukturnalne siatkówek grupy AE wykazały w warstwie ONL obecność jąder komórek fotoreceptorowych na różnym etapie apoptozy. Wiele jąder komórkowych w tej warstwie posiadało ciemną elektronowo i zagęszczoną heterochromatynę. W warstwie ONL obserwowano także jądra z wakuolami oraz jądra pozbawione chromatyny, w których pozostała tylko zdeformowana otoczka jądrowa. W grupie AE większość segmentów wewnętrznych fotoreceptorów miała uszkodzoną błonę komórkową, jasną elektronowo cytoplazmę i obrzękłe mitochondria. W grupie tej segmenty zewnętrzne fotoreceptorów były najczęściej zdeformowane, zwakuolizowane i miały zaburzony układ dysków błonowych. Ponadto, w strefie pomiędzy segmentami zewnętrznymi i wewnętrznymi obserwowano liczne wakuole. Podobnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych nie obserwowano w grupie kontrolnej i LTE.

Liczne wypustki komórek glejowych (Müllera) wypełnione filamentami pośrednimi, obecne były w przestrzeni pod-siatkówkowej i pomiędzy segmentami wewnętrznymi fotoreceptorów grupy AE. Podobnych zmian nie obserwowano w grupie kontrolnej i LTE.

W grupie AE większość komórek RGCs miała zmniejszoną ilość cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej i rybosomów w porównaniu z grupą kontrolną, oraz silnie obrzęknięte mitochondria. Podobne zmiany obrzękowe mitochondriów obecne były w IPL i NFL.

Wyniki omówione w Doświadczeniu 1 zostały przedstawione w Publikacji 4.2.1.

Natalia Ziółkowska, Małgorzata Chmielewska-Krzesińska, Alla Vyniarska, Waldemar Sienkiewicz. *Exposure to blue light reduces melanopsin expression in intrinsically photoreceptive retinal ganglion cells and damages the inner retina in rats*. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2022; 63(1): 1-11.

4.2.3.2. Badania nad wpływem światła niebieskiego o niskim natężeniu (150 lux) na siatkówkę szczurów albinotycznych. Doświadczenie 2.

4.2.3.2.1. Wpływ światła niebieskiego o niskim natężeniu (150 lux) na liczbę perikarionów ipRGCs, długość ich dendrytów i rozmieszczenie melanosyny w siatkówkach szczurów albinotycznych.

Ekspozycja szczurów albinotycznych na światło niebieskie o natężeniu 150 lux spowodowała znaczącą redukcję całkowitej długości melanosyno-pozytywnych dendrytów ipRGCs, która była 1,8-krotnie mniejsza w grupie LTE niż w grupie kontrolnej oraz 1,7 krotnie mniejsza w grupie STE w porównaniu z grupą kontrolną. Jednakże, o istotnej statystycznie redukcji tych wypustek możemy mówić jedynie w grupie LTE, ponieważ w grupie STE wystąpiła duża zmienność wewnątrzgrupowa. Podobnie jak w przypadku szczurów pigmentowanych ekspozowanych na światło niebieskie o wysokim natężeniu (1000 lux, Dośw. 1), tak i w tym przypadku obserwowano zmianę dystrybucji melanosyny w ipRGCs, która w wielu neuronach grupy LTE ograniczała się do perikarionu i początkowych odcinków jego dendrytów. Ponadto, analiza Sholla wykazała, że w obu grupach ekspozowanych na światło niebieskie nastąpił istotny spadek stopnia rozgałęziania się dendrytów w promieniu ok 100 µm od perikarionu ipRGC.

4.2.3.2.2. Wpływ światła niebieskiego o niskim natężeniu (150 lux) na morfologię siatkówki u szczurów albinotycznych – analiza immunocytochemiczna i ultrastrukturalna.

Analiza histologiczna siatkówek pochodzących od szczurów grupy przewlekłej LTE wykazała obecność nielicznych jąder z cechami apoptozy w warstwie ONL takimi jak kondensacja chromatyny i obecność ciałek apoptotycznych. Obecność apoptotycznych jąder w ONL obserwowano także w grupie STE, jednakże były one widoczne rzadziej w porównaniu z grupą LTE. W grupie STE segmenty wewnętrzne fotoreceptorów były zredukowane pod względem ilości, ale prezentowały prawidłową morfologię, natomiast w grupie LTE były one krótsze i węższe niż w grupie kontrolnej. Analiza ultrastrukturalna siatkówek grupy LTE wykazała, że wiele z tych segmentów wewnętrznych była obrzęknięta i zawierała jasną elektronowo cytoplazmę. W obu grupach poddanych ekspozycji na światło niebieskie (STE i LTE) stwierdzono ubytki segmentów zewnętrznych fotoreceptorów oraz wakuolizację ich

apikalnych części. Wakuole w apikalnych częściach segmentów zewnętrznych fotoreceptorów w obrazie mikroskopu elektronowego widoczne były jako okrągłe i elipsoidalne struktury zawierające liczne pęcherzyki i kanaliki. Analiza ultrastrukturalna siatkówek grupy LTE wykazała dodatkowo dezorganizację segmentów zewnętrznych i utratę struktury lamelarniej dysków błonowych w nich zawartych.

Barwienia TUNEL preparatów mrożeniowych siatkówek wykazały 33-krotny wzrost liczby TUNEL-pozytywnych jąder w warstwie ONL grupy LTE i 6-krotny wzrost TUNEL-pozytywnych jąder w grupie STE w porównaniu z grupą kontrolną.

Wyniki badań immunochemicznych z użyciem markera komórek glejowych, tj. kwaśnej glikoproteiny włókienkowej (GFAP), wykazały wyraźny wzrost jego ekspresji oraz zmianę w jego dystrybucji w siatkówkach szczurów grupy LTE w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie kontrolnej, ekspresję GFAP obserwowano wyłącznie w wewnętrznych warstwach siatkówki, obejmujących warstwy komórek zwojowych i NFL. W grupie LTE, GFAP-pozytywne wypustki komórek glejowych Müllera penetrowały prawie całą szerokość siatkówki. Podobnie jak w grupie kontrolnej obejmowały wewnętrzne warstwy siatkówki (GCL, NFL), gdzie reakcja była najsilniejsza, i dodatkowo pojedyncze GFAP-pozytywne wypustki obecne były także pomiędzy jądrami warstwy ONL. W grupie STE intensywność barwienia w kierunku GFAP oraz jego rozmieszczenie były porównywalne z grupą kontrolną,

Badania ultrastrukturalne wykazały obecność w siatkówkach grupy LTE grubych wypustek glejowych wypełnionych licznymi filamentami pośrednimi, które obecne były w warstwie ONL. Podobnych wypustek glejowych nie obserwowano zarówno w grupie STE, jak również kontrolnej. W przypadku obu grup eksponowanych na działanie światła niebieskiego (STE, LTE) w RGCs obserwowano wyraźny obrzęk mitochondriów oraz rozpad ich grzebieni. Podobne zmiany dotyczące mitochondriów obserwowano w wypustkach neuronalnych warstwy IPL.

Wyniki omówione w Doświadczeniu 2 zostały przedstawione w Publikacji 4.2.3.

Natalia Ziółkowska, Bogdan Lewczuk, Natalia Szyryńska, Aleksandra Rawicka, Alla Vyniarska. *Low-intensity blue-light exposure reduces melanopsin expression in intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells and damages mitochondria in retinal ganglion cells in Wistar rats*. Cells. 2023; 12(7): 1014.

4.2.3.3. Badania nad wpływem światła niebieskiego o niskim natężeniu (150 lux) na ekspresję genów związanych z fotorepcją oraz z degeneracją siatkówki w siatkówce u szczurów albinotycznych. Doświadczenie 3.

Ekspozycja szczurów albinotycznych na światło niebieskie przez 7 dni w układzie 12 h światła niebieskiego oraz 12 h ciemności, spowodowała znaczny spadek ekspresji mRNA genu rodopsyny (*Rho*) we wszystkich punktach czasowych. Różnice w poziomie mRNA *Rho* były szczególnie widoczne w siatkówkach pobranych o godzinie 23:00, 02:00 i 05:00, kiedy ekspresja genu była 4-krotnie niższa w grupie eksponowanej na światło niebieskie w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku genu melanopsyny (*Opn4*), poziom jego mRNA był znacząco obniżony w pięciu z ośmiu punktów czasowych (11:00, 14:00, 17:00 i 20:00, 23:00) w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspresja mRNA *c-Fos* w grupie kontrolnej wykazywała rytmiczność, charakteryzującą się najniższym poziomem mRNA w dzień i najwyższym w nocy. Ekspozycja szczurów na działanie światła niebieskiego spowodowała redukcję lub zniesienie rytmicznej ekspresji mRNA *c-Fos*, a poziom jego mRNA pozostawał na wysokim poziomie przez całe doświadczenie w stosunku do grupy kontrolnej. Warto podkreślić, że poziom mRNA tego genu był na poziomie maksymalnego piku obserwowanego w grupie kontrolnej. Podobnie, w przypadku anty-apoptotycznego genu *BIRC5* ekspozycja na światło niebieskie spowodowała istotny wzrost ekspresji jego mRNA, zarówno w ciągu dnia, jak i w nocy, w porównaniu z grupą kontrolną.

Badania nad wpływem światła monochromatycznego zielonego (523 nm) wykazały, że ekspozycja na światło zielone wywołała istotny spadek ekspresji mRNA *Rho*, oraz *Opn4*, ale był on mniejszy niż w przypadku spadku obserwowanego u szczurów eksponowanych na światło niebieskie. W przypadku ekspozycji na światło zielone, ekspresja mRNA *c-Fos*, podobnie jak w przypadku ekspozycji na światło niebieskie, straciła charakter rytmiczny i pozostawała na podwyższonym poziomie przez całe doświadczenie. Istotny wzrost ekspresji pod wpływem tego światła odnotowano także w przypadku mRNA *BIRC5*. W przypadku ekspozycji na światło czerwone (623 nm), poziom ekspresji wszystkich badanych genów był bardzo podobny do obserwowanego w grupie kontrolnej.

W badaniach morfologicznych preparatów siatkówek pobranych od szczurów obserwowano: skrócenie i wakuolizację segmentów zewnętrznych oraz skrócenie segmentów wewnętrznych fotoreceptorów u szczurów grupy niebieskiej; wakuolizację segmentów zewnętrznych fotoreceptorów w grupie zielonej; brak zmian w obrębie fotoreceptorów w siatkówkach grupy czerwonej i kontrolnej.

Wyniki omówione w Doświadczeniu 3 zostały przedstawione w Publikacji 4.2.2.

Natalia Ziółkowska, Bogdan Lewczuk. Profiles of *Rho*, *Opn4*, *c-Fos*, and *Birc5* mRNA expression in Wistar rat retinas exposed to white or monochromatic light. Frontiers in Neuroanatomy. 2022, 18;16:956000.

4.2.4. Dyskusja

Wyniki badań przeprowadzonych na szczurach pigmentowanych (Doświadczenie 1) wykazały, że ekspozycja ostra AE i przewlekła LTE na światło niebieskie o natężeniu 1000 lux, zmniejszą liczbę melanopsyno-pozytywnych perikarionów ipRGCs w siatkówce, a także, że ekspozycja AE, ale nie LTE na to światło, znacząco redukuje długość melanopsyno-pozytywnych dendrytów. Wyniki badań na szczurach albinotycznych (Doświadczenie 2) demonstrują, że ekspozycja krótko- STE i długoterminowa LTE na światło niebieskie o natężeniu 150 lux, istotnie redukuje liczbę melanopsyno-pozytywnych perikarionów ipRGCs w siatkówkach tych zwierząt. Uzyskane wyniki wskazują również, że ekspozycja LTE w znacznym stopniu zmniejsza długość melanopsyno-pozytywnych dendrytów oraz, że oba rodzaje ekspozycji znacząco redukuje stopień rozgałęzienia melanopsyno-pozytywnych dendrytów w ipRGCs.

Przeprowadzone badania własne po raz pierwszy demonstrują wpływ monochromatycznego światła niebieskiego na ipRGCs u szczurów pigmentowanych i albinotycznych, i wskazują na znaczące obniżenie immunoreaktywności melanopsyny w perikarionach i dendrytach tych komórek. Z wielu badań wynika, że światło i ciemność są głównymi czynnikami regulującymi ekspresję melanopsyny w siatkówce gryzoni (Hannibal i in., 2005, 2007, 2013) i że utrzymywanie zwierząt w warunkach ciągłego oświetlenia dziennego obniża ekspresję melanopsyny oraz redukuje liczbę ipRGCs w siatkówce (Hannibal i in., 2005). Jednakże, dotychczasowe badania skupiały się głównie na wpływie światła białego, a nie światła monochromatycznego niebieskiego na tę populację komórek (Grimm i in., 2001; Benedetto i in., 2017; Garcia-Ayuso i in., 2017). Jedyne badania z udziałem monochromatycznego światła niebieskiego na siatkówkę oka dotyczą określenia zależnego od rodopsyny, mechanizmu uszkadzającego działania tego światła na klasyczne fotoreceptory i zmian apoptotycznych, jakie zachodzą w tych komórkach pod jego wpływem w warunkach *in vivo* i *in vitro* (Roehlecke i in., 2011; Kuse i in., 2014; Shang i in., 2014; Krigel i in., 2016; Jaadane i in., 2020; Miralles i in., 2021). Wykazano, że u myszy monochromatyczne światło niebieskie uszkadza komórki czopkowe siatkówki i barierę krew-siatkówka indukując zmiany wysiękowe (Geiger i in., 2015) oraz, że u szczurów 30-minutowa ekspozycja na to światło powoduje hipertrofię komórek Müllera i zaburza jonową homeostazę w siatkówce (Iandiev i in., 2008). Zademonstrowano również, że światło niebieskie uszkadza nabłonek barwnikowy siatkówki i powoduje jej bliznowacenie (Jaadane i in., 2020). W związku z powyższym, badania własne są pierwszymi ukazującymi wpływ światła niebieskiego na ipRGCs i ekspresję melanopsyny.

Na stwierdzoną w badaniach własnych redukcję liczby melanopsyno-pozytywnych perikarionów pod wpływem światła niebieskiego u obu ras szczurów może mieć wpływ kilka czynników. Redukcja ta, podobnie jak obserwowane zmniejszenie długości melanopsyno-pozytywnych wypustek, może być związana z obniżeniem ekspresji melanopsyny. Wykazano bowiem, że światło jest silnym inhibitorem ekspresji melanopsyny w siatkówce wielu gryzoni (Castrucci i in., 2004; Hannibal i in., 2005, 2007; Gonzalez-Mendez i in., 2010). Dodatkowo, Garcia-Ayuso i in. (2017) wykazali przejściowy spadek ekspresji melanopsyny w siatkówkach szczurów albinotycznych eksponowanych na działanie białego światła LED. Podobnie, Hannibal i in. (2005) obserwowali spadek w ekspresji tego białka w siatkówce szczurów poddanych ciągłej ekspozycji na światło białe. Wyniki badań własnych i wyżej wymienionych sugerują, że spadek ekspresji melanopsyny pod wpływem ciągłej ekspozycji na światło niebieskie może być mechanizmem ochronnym dla siatkówki, gdyż wykazano, że pod jego wpływem melanopsyna generuje wolne rodniki szkodliwe dla siatkówki oka (Koyanagi i Terakita, 2014; Tao i in., 2019). Na stwierdzoną w badaniach własnych redukcję ogólnej długości melanopsyno-pozytywnych wypustek nerwowych i stopnia ich rozgałęzienia mogą mieć wpływ zmiany w dystrybucji melanopsyny. Znaczący spadek immunoreaktywności melanopsyny lub jej całkowity brak w części wypustek może wynikać z faktu, iż nowo powstała melanopsyna, która syntetyzowana jest w perikarionie, transportowana jest następnie do wypustek ipRGCs, dlatego też przy spadku ekspresji pod wpływem światła, immunoreaktywność będzie najpierw słabsza w dystalnych częściach wypustek, a następnie będzie obserwowana dopiero w perikarionach. Warto również podkreślić, że zademonstrowana redukcja immunoreaktywności melanopsyny może mieć związek z uszkodzeniem fotoreceptorów, gdyż wykazano, że komórki te w warunkach fizjologicznych nawiązują połączenia synaptyczne z ipRGCs i mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji tego światłoczułego barwnika (Belenky i in., 2003; Lucas i in., 2012).

Poza zmianami w ekspresji i rozmieszczeniu melanopsyny, przeprowadzone badania wykazały, że u szczurów pigmentowanych poddanych ekspozycji AE na światło niebieskie o natężeniu 1000 lux doszło do masywnej apoptozy komórek fotoreceptorowych, wakuolizacji warstwy splotowatej wewnętrznej oraz warstwy włókien nerwu wzrokowego, co wskazuje na znaczne uszkodzenie siatkówki. Warto zauważyć, że w grupie LTE, w której szczury pigmentowane (Dośw. 1) eksponowano na światło niebieskie o takim samym natężeniu jak w grupie AE, lecz z naprzemiennym występowaniem okresów światła i ciemności w ciągu doby, siatkówka nie wykazywała uszkodzeń. W związku z obserwowanym u szczurów pigmentowanych znacznym uszkodzeniem siatkówki pod wpływem ekspozycji na światło 1000

lux przez 2 dni, w przypadku szczurów albinotycznych zdecydowano się na użycie światła niebieskiego o dużo niższym natężeniu (Dośw. 2 i 3).

W grupie szczurów albinotycznych (Dośw. 2 i 3), które eksponowano na światło niebieskie o natężeniu 150 lux, uszkodzenia siatkówki obserwowano głównie w grupie LTE (7 dni ekspozycji), a w znacznie mniejszym stopniu w grupie STE (2 dni ekspozycji). Obserwowane zmiany w siatkówce miały charakter stopniowy i były skorelowane z czasem ekspozycji na światło niebieskie. W pierwszym etapie w obu grupach (STE i LTE) obserwowano wakuolizację apikalnych części segmentów zewnętrznych fotoreceptorów. Kontynuacja ekspozycji na światło niebieskie zwierząt grupy LTE, wywołała apoptozę nielicznych komórek fotoreceptorowych, uszkodzenie i skrócenie ich segmentów wewnętrznych oraz obrzęk mitochondriów w warstwie splotowej wewnętrznej.

Dowodów na uszkodzenie siatkówki u zwierząt eksponowanych na to światło dostarczyły także barwienia immunochemiczne, które wykazały znaczne zwiększenie immunoreaktywności GFAP w siatkówkach grupy LTE, co jest zbieżne z dotychczasowymi wynikami badań, z których wynika, że zwiększona ekspresja tego białka występuje w odpowiedzi siatkówki na różne czynniki uszkodzające, w tym na uszkodzające światło białe (Burns i in., 1990; De Raad i in., 1996; Iandiev i in., 2008; Jaadane i in., 2015). W naszych badaniach wykazano, że ekspresja GFAP i apoptoza w warstwie jądrazstej zewnętrznej (jądra fotoreceptorów) były większe w siatkówkach grupy LTE w porównaniu z grupą kontrolną i grupą STE, co wskazuje na zależność pomiędzy stopniem uszkodzenia fotoreceptorów a zwiększoną ekspresją GFAP. Podobną zależność obserwowano w badaniach z udziałem szczurów eksponowanych na białe światło LED (1000 lux, 2h), gdzie obserwowano, że wzrost ekspresji GFAP w siatkówce jest proporcjonalny do stopnia uszkodzenia jej fotoreceptorów (De Raad i in., 1996). Na różnice w uszkodzeniu siatkówki obserwowane pomiędzy szczurami albinotycznymi i pigmentowanymi przy ekspozycji 2 dniowej może mieć wpływ fakt, że w przypadku szczurów pigmentowanych zastosowano ekspozycję na światło niebieskie o wysokim natężeniu (1000 lux), a w przypadku szczurów albinotycznych natężenie światła niebieskiego było niskie (150 lux). Wyniki przeprowadzonych badań demonstrują po raz pierwszy, że światło niebieskie o tak niskim natężeniu jak 150 lux wywołuje apoptozę fotoreceptorów siatkówki. Wskazuje to po pierwsze na większą wrażliwość szczurów albinotycznych na uszkodzający wpływ światła, a po drugie dowodzi, że nawet tak małe natężenie jak 150 lux może mieć negatywne skutki dla siatkówki.

Wyniki badań ultrastrukturalnych wykazały uszkodzenia siatkówek u obu ras szczurów eksponowanych na światło niebieskie, jednakże były one większe w grupie szczurów pigmentowanych, w której obserwowano liczne obrzęki mitochondriów w komórkach

zwojowych siatkówki (Dośw. 1). Większe uszkodzenia w grupie szczurów pigmentowanych wynikają najprawdopodobniej z większego uszkodzenia siatkówki spowodowanego użyciem światła o większym natężeniu (1000 lux vs 150 lux). Obserwowany w niniejszych badaniach obrzęk mitochondriów może wynikać ze stresu oksydacyjnego siatkówki, wykazano bowiem, że światło niebieskie hamuje aktywność kluczowych enzymów mitochondrialnych (m.in. oksydazy cytochromowej), co wyzwała produkcję wolnych rodników działających toksycznie względem siatkówki (Chen i in., 1992; Osborne i in., 2014). Ponadto, wewnętrzna błona mitochondrialna zawiera chromofory takie jak flawiny i porfiry, które są wrażliwe na światło niebieskie i ich aktywacja może prowadzić do powstawania nadtlenu wodoru i w konsekwencji peroksydacji lipidów błonowych (Osborne i in., 2008; Agarwal i in., 2014). Warto również podkreślić, że ekspozycja obu ras szczurów na światło niebieskie o różnym natężeniu (150 lux i 1000 lux) nie wywołała apoptozy w warstwie komórek zwojowych siatkówki (ujemne wyniki barwienia TUNEL), co sugeruje, że ipRGCs są mniej wrażliwe na uszkodzający wpływ światła niebieskiego w odróżnieniu od klasycznych fotoreceptorów.

Z uwagi na fakt, że siatkówka szczurów albinotycznych okazała się dużo bardziej wrażliwa na działanie światła niebieskiego, ponieważ apoptozę fotoreceptorów obserwowano już przy ekspozycji na światło niebieskie o niskim natężeniu, w Doświadczeniu 3 badano ekspresję wybranych genów u zwierząt bardziej wrażliwych. Poza zmianami w morfologii siatkówki i w ekspresji melanopsyny pod wpływem światła niebieskiego, w badaniach własnych określono, która część z badanego widma światła widzialnego jest najbardziej uszkodzająca dla siatkówki oka szczurów albinotycznych przy natężeniu 150 lux (Dośw. 3), a ponadto, wykazano także zmiany w ekspresji istotnych genów związanych z fotorecepcją (*Rho*, *Opn4*), degeneracją siatkówki (*c-Fos*) oraz neuroprotekcją (*BIRC5*). W oparciu o dostępną literaturę są to pierwsze badania ukazujące wpływ światła monochromatycznego o różnej barwie i niskim natężeniu na ekspresję kluczowych genów związanych z fotorecepcją, degeneracją i neuroprotekcją siatkówki.

Badania własne po raz pierwszy wykazały, że uszkodzenia obserwowane w siatkówce szczurów albinotycznych pod wpływem ekspozycji na światło monochromatyczne (czerwone, zielone i niebieskie) o tak małym natężeniu jak 150 lux oraz, że zmiany w ekspresji wyżej wymienionych genów są zależne od długości fali światła (Dośw. 3). W badaniach tych wykazano, że to głównie światło niebieskie o długości fali 470 nm (najkrótsza z badanych długości fali), a w mniejszym stopniu światło zielone o długości fali 523 nm (pośredniej długości fali) znacząco redukuje ekspresję mRNA genu rodopsyny (*Rho*) i melanopsyny (*Opn4*) oraz zwiększają ekspresję mRNA genu *c-Fos* i *BIRC 5*. Zmianom w ekspresji wymienionych genów pod wpływem tych światła towarzyszyły także umiarkowane zmiany w

obrębie fotoreceptorów takie jak skrócenie ich segmentów zewnętrznych i ich wakuolizacja (światło niebieskie) oraz niewielka wakuolizacja segmentów zewnętrznych fotoreceptorów (światło zielone). Z kolei w przypadku ekspozycji szczurów na światło czerwone o długości fali 623 nm (największej długości fali), nie obserwowano zmian patologicznych w obrębie siatkówki, a ekspresja wyżej wymienionych genów była bardzo zbliżona do wyników uzyskanych w grupie szczurów eksponowanych na światło białe (kontrola).

Największy spadek ekspresji mRNA *Rho* obserwowano w grupach zwierząt poddanych ekspozycji na światło o krótkiej i pośredniej długości fali (tj. niebieskie i zielone), czyli w grupach, w których obserwowano także umiarkowane uszkodzenia fotoreceptorów. Ponieważ rodopsyna obecna w segmentach zewnętrznych pręcików pośredniczy w uszkadzającym wpływie światła na siatkówkę oka, a ilość dostępnego białka w fotoreceptorach determinuje stopień uszkodzenia siatkówki przez to światło (Grimm i in., 2001), obserwowany przez nas spadek ekspresji mRNA *Rho* pod wpływem światła niebieskiego i zielonego (jeśli by połączyć je ze spadkiem ekspresji białka rodopsyny) stanowią najprawdopodobniej mechanizm ochronny, zapobiegający dalszym uszkodzeniom spowodowanym przez światło niebieskie.

Podobnie, jak w przypadku mRNA *Rho*, pod wpływem ekspozycji na światło niebieskie i zielone, znacznemu obniżeniu uległa także ekspresja mRNA *Opn4* (Dośw. 3). Pomimo faktu obniżenia ekspresji mRNA *Opn4* w trakcie 7 dni doświadczenia, obserwowano wyraźny wzrost jego mRNA na początku fazy ciemnej cyklu dobowego, podobnie jak ma to miejsce w warunkach fizjologicznego cyklu dobowego u szczurów (Hannibal i in., 2005, 2013). Dotychczas nie określono czy melanopsyna pośredniczy w uszkadzającym wpływie światła niebieskiego na ipRGCs, ale biorąc pod uwagę, że pod jego wpływem melanopsyna produkuje reaktywne formy tlenu (Chen i in., 1992; Osborne i in., 2014), obniżenie jej ekspresji, podobnie jak w przypadku *Rho*, może być mechanizmem ochronnym, redukującym ryzyko uszkodzenia oksydacyjnego neuronów siatkówki.

Kolejnym genem, którego ekspresja uległa zmianie pod wpływem światła monochromatycznego o natężeniu 150 lux był gen związany z degeneracją siatkówki *c-Fos*. Wyniki naszych badań wykazały, że pod wpływem ekspozycji na światło niebieskie i w mniejszym stopniu na światło zielone o małym natężeniu (150 lux) w siatkówce szczurów albinotycznych zachodzi istotny wzrost ekspresji mRNA *c-Fos* w ciągu dnia, co wskazuje na uszkadzający wpływ tego światła nawet w tak małym natężeniu. Ponadto, ekspozycja na to światło wywołała zanik rytmicznej ekspresji mRNA tego genu, którą obserwowano w grupie szczurów eksponowanych na światło białe (kontrolnej) i światło czerwone. Dotychczas wykazano, że *c-Fos* jest protoonkogenem i kluczowym czynnikiem zaangażowanym w śmierć fotoreceptorów wywołaną fototoksycznym działaniem światła (Hafezi i in., 1997) oraz, że

odgrywa istotną rolę w śmierci i regeneracji komórek zwojowych siatkówki (Oshitari i in., 2002). Ponadto, Grimm i in. (2000) stwierdzili, że ekspozycja szczurów na impulsy światła białego o niskim natężeniu (nie uszkadzającym siatkówki) powoduje gwałtowny wzrost *c-Fos*, a następnie jego spadek, podczas gdy jego wzrost utrzymuje się stale na wysokim poziomie w przypadku ekspozycji na światło o wysokim natężeniu, które uszkadza siatkówkę. Wyniki badań własnych sugerują, że wzrost ekspresji mRNA *c-Fos* w siatkówkach szczurów grupy zielonej i niebieskiej, ale nie w siatkówkach szczurów eksponowanych na światło białe i czerwone, może być skorelowany ze stopniem uszkodzenia fotoreceptorów, które obserwowano tylko w przypadku dwóch pierwszych grup. Wykazano, że uszkodzenia takie jak skrócenie segmentów zewnętrznych i ich wakuolizacja są charakterystyczne dla wczesnego, odwracalnego uszkodzenia fotoreceptorów wywołanego światłem, opisanego we wcześniejszych badaniach (Szczesny i in., 1995; Grimm i in., 2001).

Wyniki naszych badań dotyczące wzrostu ekspresji genu *BIRC5* kodującego syntezę białka o działaniu anty-apoptotycznym i neuroprotektynym świadczą o fototoksycznym wpływie światła o krótkiej i pośredniej długości fali (niebieskie oraz zielone) na siatkówkę. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że ekspresja mRNA *BIRC5* zwiększyła się istotnie w siatkówkach szczurów eksponowanych jedynie na światło niebieskie i zielone, ale nie na światło czerwone i białe (kontrola). Jeśli wziąć pod uwagę zmiany w obrębie fotoreceptorów obserwowane w grupie niebieskiej i zielonej oraz spadek ekspresji genów *Rho* i *Opn4*, można przypuszczać, że wzrost ekspresji *BIRC5* w tych grupach stanowi kolejny mechanizm chroniący neurony siatkówki przed uszkadzającym wpływem światła, w którym pośredniczy rodopsyna.

4.2.5. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, w niniejszych badaniach po raz pierwszy wykazano negatywny wpływ monochromatycznego światła niebieskiego na komórki zwojowe siatkówki z melanopsyną. Ze względu na ważną funkcję tych komórek w regulacji procesów zachodzących w rytmie dobowym, kontynuacją badań będzie ocena funkcjonalna zarówno tych komórek jak i całej siatkówki w odpowiedzi na stymulację światłem niebieskim. Wyniki badań pokazują również, że światło niebieskie, o dotychczas niebadanym, niskim natężeniu wpływa negatywnie na siatkówkę oka szczurów, co może sugerować, iż podobna odpowiedź na taki czynnik może wystąpić także u innych gatunków ssaków i człowieka.

Wnioski:

1. W wyniku spadku ekspresji światłoczułego barwnika w ipRGCs – melanopsyny - światło niebieskie może przyczyniać się do zmniejszonej pobudliwości tych komórek.

2. Powstające na skutek stresu oksydacyjnego wywołanego światłem niebieskim uszkodzenia mitochondriów w komórkach zwojowych siatkówki oraz w ich aksonach formujących nerw wzrokowy, mogą wywoływać zaburzenia transmisji sygnału pomiędzy ipRGCs a wybranymi obszarami mózgu.
3. Uszkodzenie siatkówki rośnie wprost proporcjonalnie do wzrostu energii światła (co jest równoznaczne ze spadkiem długości fali światła) nawet przy jego niskim natężeniu.
4. Światło niebieskie i w mniejszym stopniu światło zielone o niskim natężeniu wywołują nieznaczne uszkodzenie siatkówki.
5. Monochromatyczne światło niebieskie i zielone indukuje mechanizmy ochronne w siatkówce oka przejawiające się obniżeniem ekspresji genów związanych z fotorecepcją (*Rho* i *Opn4*) i wzrostem ekspresji genów związanych z neuroprotekcją (*BIRC5*).

4.2.6. Piśmiennictwo

- Adida, C., Crotty, P.L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., Altieri, D.C. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol.* 1998; 152:43–49.
- Aggarwal, B.B., Quintanilha, A.T., Cammack, R., Packer, L. Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light. *Biochim Biophys Acta Bioener.* 2014; 502:367–382.
- Aranda M.L., Schmidt T.M. Diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: circuits and functions. *Cell Mol Life Sci.* 2020; 78:889–907.
- Belenky M.A., Smeraski C.A., Provencio I., Sollars P.J., Pickard G.E. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J Comp Neurol.* 2003; 460:380–393.
- Benedetto, M.M., Guido, M.E., Contin, M.A. Non-Visual Photopigments Effects of Constant Light-Emitting Diode Light Exposure on the Inner Retina of Wistar Rats. *Front Neurol.* 2017; 8:417.
- Berson, D.M. Strange vision: Ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 2003; 26:314–320.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 2002; 295:1070–1073.
- Bristow, E.A., Griffiths, P.G., Andrews, R.M., Johnson, M.A., Turnbull, D.M. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:791–796.

- Burns, M.S., Robles, M. Müller cell GFAP expression exhibits gradient from focus of photoreceptor light damage. *Curr Eye Res.* 1990; 9:479–486.
- Castrucci, A.D.L., Ihara, N., Doyle, S.E., Rollag, M.D., Provencio, I., Menaker, M. Light regulation of melanopsin-positive retinal ganglion cells in the albino hamster. *ARVO Annual Meeting Abstract. Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:4645.
- Chen E, Soderberg P.G, Lindstrom B. Cytochrome oxidase activity in rat retina after exposure to 404 nm blue light. *Curr Eye Res.* 2002; 11:825–831.
- Chen, P.G., Soderberg, W. Qian Inhibition of cytochrome oxidase by blue light (404 nm). A factor that causes retinal injury? *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33:919.
- Danias J., Shen F., Goldblum D., Chen B., Ramos-Esteban, J., Podos, S.M., Mittag, T. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:587–594.
- de Raad, S., Szczesny, P.J., Munz, K., Remé, C.E. Light damage in the rat retina: Glial fibrillary acidic protein accumulates in Müller cells in correlation with photoreceptor damage. *Ophthalmic Res.* 1996; 28:99–107.
- Downs, L. M., Beltran, W. A., Aguirre, G. D. Expression of apoptosis inhibiting proteins, XIAP and Survivin, in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56:5523.
- Fernandez, D.C., Chang, Y.T., Hattar, S., Chen, S.K. Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *PNAS.* 2016; 113:6047–6052.
- Galindo-Romero, C., Jiménez-López, M., Garcia-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F.M., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res.* 2013; 108:84–93.
- García-Ayuso, D., Galindo-Romero, C., Di Pierdomenico, J., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas Pérez, M.P. Light-induced retinal degeneration causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina. *Exp Eye Res.* 2017; 161:10–16.
- García-Ayuso, D., Di Pierdomenico, J., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P. Retinal ganglion cell death as a late remodeling effect of photoreceptor degeneration. *IJMS;* 2019; 20:4649.
- Geiger, P., Barben, M., Grimm, C., Samardzija, M. Blue light-induced retinal lesions, intraretinal vascular leakage and edema formation in the all-cone mouse retina. *Cell Death Dis.* 2015; 6(11), e1985-e1985.
- Gonzalez-Menendez, I., Contreras, F., Cernuda-Cernuda, R., Provencio, I., Garcia- Fernandez, J.M. Postnatal development and functional adaptations of the melanopsin photoreceptive system in the albino mouse retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:4840–4847.

- Grimm, C., Wenzel, A., Williams, T., Rol, P., Hafezi, F., Reme, C. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:497–505.
- Grimm, C., Wenzel, A., Hafezi, F., Reme, C.E. Gene expression in the mouse retina: The effect of damaging light. *Mol Vis.* 2000; 6:252–260.
- Güler, A., Ecker, J., Lall, G., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., Hankins, M.W., Berson, D.M., Lucas, R.J., Yau, K-W., Hattar, S. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature.* 2008; 453:102–105.
- Hafezi, F., Steinbach, J.P., Marti, A., Munz, K., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., Aguzzi, A., Remé, C.E. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med.* 1997; 3:346–349.
- Hannibal, J., Georg, B., Fahrenkrug, J. Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp Eye Res.* 2013; 106:55–63.
- Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., and Fahrenkrug, J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci.* 2005; 27:147–155.
- Hannibal, J., Georg, B., Fahrenkrug, J. Melanopsin changes in neonatal albino rat independent of rods and cones. *Neuroreport.* 2007; 18:81–85.
- Ham, W.T., Jr., Mueller, H.A., Sliney, D.H. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature.* 1976; 260:153–155.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 2002; 295:1065–1070.
- He, L., Campbell, M.L., Srivastava, D., Blocker, Y.S., Harris, J.R., Swaroop, A., Fox, D.S. Spatial and temporal ex-pression of AP-1 responsive rod photoreceptor genes and bZIP transcription factors during development of the rat retina. *Mol Vis.* 1998; 4:12175–12184.
- Iandiev, I., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Grimm, C., Remé, C.E., Reichenbach, A., Pannicke, T., Bringmann, A. Müller Cell Response to Blue Light Injury of the Rat Retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:3559–3567.
- Jaadane, I., Boulenguez, P., Chahory, S., Carré, S., Savoldelli, M., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Torriglia, A. Retinal Damage Induced by Commercial Light Emitting Diodes (LEDs). *Free Radic Biol Med.* 2015; 84:373–384.
- Jaadane, I., Villalpando Rodriguez, G., Boulenguez, P., Carré, S., Dassieni, I., Lebon, C., Chahory, S., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Torriglia, A. Retinal phototoxicity and the

- evaluation of the blue light hazard of a new solid-state lighting technology. *Sci Rep.* 2020; 10:6733.
- Jiang, Y., De Bruin, A., Caldas, H., Fangusaro, J., Hayes, J., Conway, E.M., Robinson, M.L., Altura, R.A. Essential role for survivin in early brain development. *J Neurosci.* 2005; 25:6962–6970.
- Johnson, G.D., Davidson, R.S., McNamee, K.C., Russell, G., Goodwin, D., Holborow, E.J. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J Immunologic Meth.* 1982;55(2):231–242.
- Kamahis, W., Cailotto, C., Dijk, F., Bergen, A., and Buijs, R.M. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330:18–26.
- Kuse, Y., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H. Damage of Photoreceptor-Derived Cells in Culture Induced by Light Emitting Diode-Derived Blue Light. *Sci Rep.* 2014; 4:5223.
- Koyanagi, M., Terakita, A. Diversity of animal opsin based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1837:710–716.
- Krigel, A., Berdugo, M., Picard, E., Levy-Boukris, R., Jaadane, I., Jonet, L., Dernigoghossian, M., Andrieu-Soler, C., Torriglia, A., Behar-Cohen, F. Light-induced Retinal Damage Using Different Light Sources, Protocols and Rat Strains Reveals LED Phototoxicity. *Neuroscience.* 2016; 339:296–307.
- Kumar, R., Chen, S., Scheurer, D., Wang, Q.L., Duh, E., Sung, C.H., Rehemtulla, A., Swaroop, A., Adler, R., Zack, D.J. The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem.* 1996; 271:29612–29618.
- Li, D., Fang, P., Liu, H., Chen, L., Fu, Y., Liu, J., Gu, P. The clinical effect of blue light therapy on patients with delayed sleep-wake phase disorder. *Nat Sci Sleep.* 2022; 14:75.
- Lucas, R.J., Lall, G.S., Allen, A.E., Brown, T.M. How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog Brain Res.* 2012; 199:1–18.
- Miralles de Imperial-Ollero, J.A., Gallego-Ortega, A., Norte-Muñoz, M., Di Pierdomenico, J., Bernal-Garro, J.M., Valiente-Soriano, F.J., Vidal-Sanz, M. Short-and Long-Term Study of the Impact of Focal Blue Light-Emitting Diode-Induced Phototoxicity in Adult Albino Rats. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:9742.
- Mure, L.S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells of the human retina. *Front Neurol.* 2021; 12:636330.

- Nir, I., Agarwal, N. Diurnal expression of c-fos in the mouse retina. *Brain Res.* 1993; 19:47–54.
- Osborne, N.N., Nunez-Alvarez, C., del Olmo-Aguado, S. The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells. *Exp Eye Res.* 2014; 128:8–14.
- Osborne, N.N., Li, G.Y., Ji, D., Mortiboys, H.J., Jackson, S. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: Possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J. Neurochem.* 2008; 105:2013–2028.
- Oshitari, T., Dezawa, M., Okada, S., Takano, M., Negishi, H., Horie, H., Sawada, H., Tokuhisa, T., Adachi-Usami, E. The role of c-fos in cell death and regeneration of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:2442–2449.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *PNAS.* 1998; 95:340–345.
- Pickard, G.E., Baver, S.B., Ogilvie, M.D., Sollars, P.J. Light-induced Fos expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in melanopsin knockout (*Opn4^{-/-}*) mice. *PLoS One*, 2009; 4:e4984.
- Ratnayake, K., Payton, J.L., Meger, M.E., Godage, N.H., Gionfriddo, E., Karunaratne, A. Blue light-triggered photochemistry and cytotoxicity of retinal. *Cell Signal.* 2020; 69:109547
- Roehlecke, C., Schumann, U., Ader, M., Knels, L., Funk, R.H. Influence of blue light on photoreceptors in a live retinal explant system. *Mol Vis.* 2011; 17:876–884.
- Roeklein K.A., Rohan K.J., Duncan W.C., Rollag M.D., Rosenthal N.E., Lipsky R.H., Provencio I. A missense variant (P10L) of the melanopsin (OPN4) gene in seasonal affective disorder. *J Affect Disord.* 2009; 114:279–285.
- Samardzija, M., Todorova, V., Gougoulakis, L., Barben, M., Nötzli, S., Klee, K., Storti, F., Gubler, A., Imsand, C., Grimm, C. Light stress affects cones and horizontal cells via rhodopsin-mediated mechanisms. *Exp Eye Res.* 2019; 186:107719.
- Schmidt, T.M., Alam, N.M., Chen, S., Kofuji, P., Li, W., Prusky, G.T., Hattar, S. A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection. *Neuron.* 2014; 82:781–788.
- Semo, M., Lupi, D., Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G. Light induced C-Fos in Melanopsin Retinal Ganglion Cells of Young and Aged rodless/coneless (*rd/rd Cl*) Mice. *Eur J Neurosci.* 2003; 18:3007–3017.

- Shang, Y.M., Wang, G.S., Sliney, D., Yang, C.H., Lee, L.L. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environ. Health Perspect.* 2014; 122:269–276.
- Shang, Y., Wang, G., Sliney, D.H., Yang, C., Lee, L. Light-emitting diode induced retinal damage and its wavelength dependency in vivo. *Int J Ophthalmol.* 2017; 10:191–202.
- Sondereker, K.B., Onyak, J.R., Islam, S.W., Ross, C.L., Renna, J.M. Melanopsin Ganglion Cell Outer Retinal Dendrites: Morphologically Distinct and Asymmetrically Distributed in the Mouse Retina. *J Comp Neurol.* 2017; 525:3653–3665.
- Szczesny, P.J., Munz, K., Remé, C.E. Light damage in rat retina: Patterns of acute lesions and recovery. *Cell Tissue Prot Ophthalmol.* 1995; 54:163–175.
- Tao, J., Zhou, W., Zhu, X. Mitochondria as Potential Targets and Initiators of the Blue Light Hazard to the Retina. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:6435364.
- Tao, L., Pandey, S., Simon, M.I., Fong, H.K. Structure of the bovine transducin gamma subunit gene and analysis of promoter function in transgenic mice. *Exp Eye Res.* 1993; 56:497–507.
- Qi, X., Kumbalasiri, T., Carlson, S.M., Wong, K.Y., Krishna, V., Provencio, I., Berson, D.M. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature.* 2005; 433:745–749.
- Wan, J., Zheng, H., Hu, B.Y., Xiao, H-L., She, Z-J., Chen, Z-L., Zhou, G-M. Acute photoreceptor degeneration down-regulates melanopsin expression in adult rat retina. *Neurosci Lett.* 2006; 400:48–52.

4.3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

4. 3. 1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

4.3.1.1. *Badania nad biosyntezą melatoniny i mechanizmami jej regulacji w szyszynce gęsi domowej*

W związku z realizowanym w latach 2009-2014 w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie grantem badawczym dotyczącym procesów wydzielniczych i mechanizmów ich regulacji w szyszynkach wybranych gatunków ptaków blaszkodziobych (gęś, kaczka), w trakcie trwania studiów doktoranckich podjęłam badania nad mechanizmami regulacji wydzielania melatoniny i innych indolamin w szyszynce gęsi domowej w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Celem badań było poszerzenie zakresu wiedzy na temat biosyntezy melatoniny i mechanizmów regulujących ten proces w szyszynce gęsi domowej. W związku z tym przeprowadzono doświadczenia w warunkach *in vivo* i *in vitro*, służące: 1) określeniu dobowych i okołodobowych profili zawartości wybranych związków

indolowych oraz katecholamin, ich prekursorów i metabolitów w szyszynce gęsi; 2) scharakteryzowaniu relacji ilościowych pomiędzy w/w związkami; 3) poznaniu zmian poziomów indoli w szyszynce zachodzących podczas adaptacji ptaków od odwróconego cyklu świetlnego oraz wywołanych ekspozycją na światło podczas nocy; 4) poznaniu roli unerwienia adrenergicznego w regulacji aktywności wydzielniczej szyszynki gęsi oraz 5) określeniu roli światła odbieranego bezpośrednio przez pinealocyty i generatora wewnątrzszyszynkowego w regulacji wydzielania melatoniny.

Oznaczenia zawartości związków indolowych w szyszynkach wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją fluorescencyjną, zaś katecholamin, ich prekursorów i metabolitów – techniką HPLC z detekcją elektrochemiczną. Stężenie melatoniny w próbkach medium z hodowli szyszynek określano metodą radioimmunologiczną bezpośrednią, dodatkowo w wybranych próbkach oznaczano zawartość indoli metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

Badania przeprowadzone w warunkach *in vivo* wykazały, że zawartość 5-hydrokсыtryptofanu, serotoniny, N-acetyloserotoniny, melatoniny, kwasu 5-hydrokсыindolooctowego, kwasu 5-metokсыindolooctowego, 5-metokсыtryptofolu i 5-metokсыtryptaminy w szyszynce gęsi utrzymywanych w warunkach cyklu świetlnego 12L:12D (12 godzin światła i 12 godzin ciemności) zmienia się istotnie w trakcie doby. Poziomy 5-hydrokсыtryptofanu, N-acetyloserotoniny, melatoniny i 5-metokсыtryptaminy i kwasu 5-metokсыindolooctowego były wyższe w nocy niż w dzień, zaś zawartość serotoniny, kwasu 5-hydrokсыindolooctowego i 5-metokсыtryptofolu osiągały najwyższe wartości w drugiej połowie dnia i pierwszej połowie nocy. Szyszynka gęsi domowej charakteryzuje się małą zawartością 5-metokсыtryptofolu, natomiast bardzo dużą – 5-metokсыtryptaminy. W trakcie doby zmianie ulegają proporcje zawartości N-acetyloserotoniny i melatoniny, co wskazuje na istotną rolę O-metylotransferazy N-acetyloserotoninowej w regulacji biosyntezy hormonu szyszynki.

U gęsi przebywających przez 10 dni w warunkach ciągłej ciemności aktywność szyszynki związana z przemianami związków indolowych wykazywała rytm okołodobowy. Zawartość badanych indoli nie wykazywała istotnych zmian okołodobowych u gęsi przebywających przez 10 dni w ciągłym oświetleniu. W warunkach *in vivo* aktywność szyszynki gęsi w zakresie przemian związków indolowych bardzo szybko przystosowywała się do odwróconego cyklu świetlnego.

Badania nad zawartością katecholamin, ich prekursorów i metabolitów w szyszynce gęsi, wykonane w celu oceny znaczenia unerwienia współczulnego w regulacji przemian indoli, pozwoliły na stwierdzenie, że:

- zawartość noradrenaliny i dopaminy w szyszynce gęsi domowej nie ulega istotnym zmianom w przebiegu cyklu dobowego, natomiast poziomy ich metabolitów – DOPAC, kwasu homowanilinowego i kwasu wanilinomigdałowego różnią się znacznie pomiędzy dniem a nocą;
- zmiany zawartości kwasu wanilinomigdałowego mogą być traktowane jako marker zmian intensywności transmisji adrenergicznej w szyszynce;
- ekspozycja na światło podczas nocy prowadzi do spadku zawartości noradrenaliny i wzrostu poziomu kwasu wanilinomigdałowego.

Uzyskane wyniki wskazują na kluczową rolę unerwienia adrenergicznego w kształtowaniu dobowego i okołodobowego rytmu przemian indoli w szyszynce gęsi, jak również podczas adaptacji aktywności gruczołu do zmienionych warunków oświetlenia.

W przepływowej hodowli narządowej, prowadzonej w warunkach oświetlenia 12L:12D, szyszynki gęsi wydelały melatoninę w rytmie dobowym, ze stopniowym wzrostem sekrecji w pierwszej części nocy, szczytem w jej środku i spadkiem w drugiej części nocy. Doświadczenia polegające na zmianie warunków oświetlenia oraz inkubacji w obecności noradrenaliny pozwoliły na stwierdzenie, że:

- w szyszynce gęsi funkcjonuje endogenne oscylator, odpowiedzialny za generowanie okołodobowego rytmu sekrecji MLT, którego aktywność utrzymuje się przez kilka dni w pinealocytach hodowanych w warunkach ciągłej ciemności;
- pinealocyty gęsi posiadają zdolność bezpośredniego odbioru bodźców świetlnych, które wpływają na sekrecję melatoniny głównie poprzez zmiany w aktywność endogenne oscylatora, bowiem ich działanie hamujące na sekrecję hormonu szyszynki jest bardzo ograniczone;
- endogenne oscylator ma zdolność „zapamiętywania” zmian parametrów cyklu świetlnego;
- ciągłe oświetlenie eliminuje rytmiczne zmiany sekrecji melatoniny w pinealocytach gęsi;
- noradrenalina wywiera silne działanie hamujące na wydzielanie hormonu szyszynki i poprzez odpowiednie dozowanie sygnału adrenergicznego możliwe jest indukowanie rytmicznych zmian w sekrecji melatoniny z eksplantów hodowlanych w warunkach ciągłej ciemności i ciągłego oświetlenia.

Wyniki uzyskane w ramach projektu (NCN, NN308 069937) zostały przedstawione w rozprawie doktorskiej pt. „*Badania nad biosyntezą melatoniny i mechanizmami jej regulacji w szyszynce gęsi domowej*”, której obrona miała miejsce 18 czerwca 2015 na Wydziale

Autoreferat: dr n. wet. Natalia Ziółkowska

Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Powyższe wyniki badań zostały opublikowane w formie dwóch artykułów oryginalnych (1.21 i 1.26).

Efektom przeprowadzonych powyższych badań są następujące publikacje:

Ziółkowska N., Lewczuk B., Prusik M. Diurnal and circadian variations in indole contents in the goose pineal gland. *Chronobiol Int.* 2018, 35(11):1560-1575. **MEiN = 35; IF₂₀₁₉ = 2,562**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji, zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 55%.

Ziółkowska N*., Lewczuk B. Norepinephrine Is a Major Regulator of Pineal Gland Secretory Activity in the Domestic Goose (Anseranser). *Front Physiol.* 2021; 12:1–14.

MEiN = 100; IF = 4,755

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

** autor korespondencyjny*

4.3.1.2. Badania nad budową szyszynki ptaków

Przed uzyskaniem stopnia doktora moje zainteresowania naukowe związane były głównie z tematyką dotyczącą badań morfologicznych nad szyszynką ptaków. Badania te w głównej mierze dotyczyły budowy anatomicznej i histologicznej oraz ultrastrukturalnej szyszynki mewy i indyka. Badania nad szyszynką mewy wykazały, że jest ona zbudowana z dwóch części: szerszej i powierzchownie leżącej oraz z węższej i dłuższej części leżącej głębiej, połączonej z międzymózgowiem za pomocą splotu naczyniówkowego. Ponadto, stwierdzono obecność szyszynki dodatkowej tylnie w stosunku do splotu naczyniówkowego. Badania histologiczne pozwoliły na sklasyfikowanie szyszynki mewy jako narządu o budowie lito-pęcherzykowej, w obrębie którego znajdują się 2 rodzaje pinealocytów linii fotoreceptorowej: pinealocyty szczątkowo-receptorowe oraz pinealocyty wydzielnicze. Badania ultrastrukturalne tych komórek wykazały unikalne, dotychczas nie znane cechy budowy, takie jak: obecność struktur parakrystalicznych w wypustkach przypodstawnych komórek, obecność ziarnistości glikogenu w formie agregatów oraz obecność mitochondriów w formie dużych skupisk. Unikalne, dotychczas nieopisane u innych gatunków kręgowców cechy budowy pinealocytów szyszynki mewy mogą być odzwierciedleniem warunków środowiskowych w jakich ten ptak żyje.

Kolejne badania z tego nurtu dotyczyły ultracytochemicznej lokalizacji jonów wapnia w szyszynce indyka domowego. Ze względu na istotną rolę jonów wapnia w sekrecji melatoniny, przeprowadzono badania ultrastrukturalne mające na celu określenie rozmieszczenia tych jonów w szyszynce indyka na poziomie komórkowym. Badania te wykazały obecność, licznych, dużych rozmiarów precypitatów wapniowych w tkance łącznej znajdującej się między pęcherzykami szyszynki. Liczba precypitatów była znacząco mniejsza w obrębie samych pęcherzyków, w porównaniu ze zrębem łącznotkankowym i ograniczała się głównie do przestrzeni międzykomórkowych pomiędzy pinealocytami formującymi pęcherzyki. W obrębie pinealocytów, największe ilości złogów wapniowych obserwowano w jądrze komórkowym, mitochondriach i kanalikach siateczki śródplazmatycznej gładkiej. Nieliczne złogi obecne były także w apikalnych wypustkach pinealocytów szczątkowo-receptorowych. Najmniej precypitatów obserwowano w komórkach podporowych ściany pęcherzyków.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w 2 pracach oryginalnych:

Przybylska-Gornowicz B., Lewczuk B., Prusik M., Kalicki M., **Ziółkowska N.** Morphological studies of the pineal gland in the common gull (*Larus Canus*) reveal uncommon features of pinealocytes. *Anat Rec.* 2012; 295:673–685. **MEiN = 30; IF = 1,343**

Lewczuk B., Prusik M., **Ziółkowska N.**, Przybylska-Gornowicz B. Ultracytochemical localization of calcium ions in the pineal gland of the domestic Turkey. *J Elem.* 2012; 17:609– 629. **MEiN = 15; IF = 0,281**

Mój wkład w powstanie tych prac polegał na: zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

4.3.2.1. Badania immunocytochemiczne i ultrastrukturalne nad rozwojem szyszynki u indyków

Po obronie pracy doktorskiej, jako promotor pomocniczy brałam udział w dalszych pracach dotyczących budowy szyszynki indyka, które polegały na charakterystyce zmian zachodzących na poziomie komórkowym w tym narządzie u indyka w okresie powylęgowym. W związku z tym badania przeprowadzono na indykach w wieku 2 dni, 2, 4, 10, 20, 30, 40 oraz 56 tygodni. Badania te wykazały, że szyszynkę indyków, niezależnie od wieku, budują komórki wykazujące pozytywną reakcję na obecność białka enzymatycznego ASMT (O-metylotransferaza N-acetyloserotoniny). Wśród tych komórek wyróżniono pinealocyty szczątkowo-receptorowe i pinealocyty wydzielnicze. Drugim typem budującym pęcherzyki

szyszynki indyka były komórki podporowe wykazujące immunoreaktywność względem kwaśnego białka włókienek glejowych (GFAP). Wśród komórek GFAP-pozytywnych wyróżniono komórki ependymocyto-podobne i astrocyto-podobne. Przeprowadzone badania immunocytochemiczne i ultrastrukturalne wykazały, że pinealocyty szczątkowo-receptorowe i komórki ependymocyto-podobne budują głównie wewnętrzną ścianę pęcherzyków, a pinealocyty wydzielnicze i komórki astrocyto-podobne ich zewnętrzną część. Przeprowadzone badania morfologiczne pozwoliły na wyróżnienie 3 typów pęcherzyków szyszynki w zależności od wieku: pęcherzyków charakterystycznych dla osobników młodych w wieku 2 dni - 10 tygodni, pęcherzyków pośrednich obserwowanych u osobników w wieku 20-30 tygodni, oraz pęcherzyków charakterystycznych dla osobników starszych w wieku 40-56 tygodni. Poszczególne formy rozwoju pęcherzyków różniły się między sobą wymiarami części zewnętrznej i wewnętrznej ściany pęcherzyka oraz organizacją ultrastrukturalną pinealocytów szczątkowo-receptorowych, których wzmożony rozwój następował dopiero po 20 tygodniu życia ptaków i charakteryzował się przybraniem wydłużonego kształtu i regularnym rozmieszczeniem organelli. Z kolei u najstarszych osobników komórki te wykazywały wyraźne zmiany wsteczne. Liczba i rozmiary pinealocytów wydzielniczych zwiększały się z wiekiem, a zmiany w komórkach podporowych dotyczyły głównie zwiększonej akumulacji filamentów pośrednich która zachodziła wraz z wiekiem ptaków.

Kolejne badania z tego nurtu dotyczyły określenia roli pinopsyny jako barwnika światłoczułego w szyszynce indyka w zależności od wieku. Badania te wykazały, że dystrybucja pinopsyny różni się znacząco w zależności od wieku ptaków. U ptaków najstarszych obserwowano wzrost zawartości pinopsyno-pozytywnych struktur w zewnętrznych częściach pęcherzyków oraz spadek liczby i zmniejszenie wielkości pinopsyno-pozytywnych wypustek apikalnych pinealocytów. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na wzrastającą z wiekiem ptaków rolę pinealocytów wydzielniczych w pełnieniu funkcji światłoczułej w szyszynce indyka. Z kolei w badaniach *in vitro* wykazano, że szyszynki pobrane od ptaków starszych są mniej wrażliwe na działanie światła nocą, niż szyszynki pobrane od ptaków młodych, co wskazuje na różnice we wrażliwości na światło pomiędzy pinealocytami szczątkowo-receptorowymi a pinealocytami wydzielniczymi.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w 2 pracach oryginalnych:

Petrusewicz-Kosińska M., Przybylska-Gornowicz B., **Ziółkowska N.**, Martyniuk K., Lewczuk B. Developmental morphology of the turkey pineal organ. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Micron*. 2019; 122:8–20. **MEiN = 100; IF = 1,726**

Petrusewicz-Kosińska M., Przybylska-Gornowicz B., Prusik M., **Ziółkowska N.**, Lewczuk B.

Pinopsin and photoreception in the pineal organ of the domestic turkey during post-hatching development. *Micron*. 2019; 126:102749. **MEiN = 100; IF = 1,726**

Mój wkład w powstanie tych prac polegał na: zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

4.3.2.2. Badania nad zasiedlaniem przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ komór oka

Pierwsze badania z tego cyklu były prowadzone na myszach, a ich wyniki sugerują, że u tego gatunku komór oka, jako strefa efektorowa odpowiedzi immunologicznej, stanowią element normalnego szlaku migracyjnego naiwnych limfocytów T CD8⁺, przy czym większość tych komórek, w przeciwieństwie do ich odpowiedników we krwi, wykazuje niską ekspresję cząsteczki CD8. Przeprowadzone badania ujawniły jedynie śladowy udział limfocytów T CD4⁺ w populacji limfocytarnej komór oka myszy, gdyż ich średni odsetek wynosił zaledwie 0,56%. Z badań wynika, że taki selektywny i specyficzny sposób zasiedlania komór oka przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ jest zaangażowany w utrzymanie statusu immunologicznego uprzywilejowania oka.

Kolejne badania z tego obszaru prowadzono u bydła i świń, u których stwierdzono, że w komorach ich oczu występują limfocyty T o fenotypach CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ i CD4⁺CD8⁺, chociaż ich liczebność bezwzględna była bardzo mała. Przeprowadzone badania wykazały, że pod względem udziału odsetkowego limfocytów T CD4⁺, populacja limfocytarnej komór oka bydła nie różniła się istotnie od tej we krwi obwodowej. Z kolei w przypadku limfocytów T CD8⁺, udział tych komórek w populacji limfocytarnej na terenie komór oka był mniejszy w porównaniu do analogicznej populacji we krwi. Komory oka bydła okazały się niezwykle pod względem obecności komórek dendrytycznych, gdyż ich udział w populacji limfocytarnej tam występującej był ok. 5-krotnie większy niż we krwi, przy czym większość tych komórek wykazywało niską ekspresję zarówno cząsteczki CD4, jak i CD8. W przypadku świń, stwierdzono, że podobnie jak u myszy, udział odsetkowy limfocytów T CD4⁺ w populacji limfocytarnej był bardzo mały. Pod względem udziału odsetkowego w populacji limfocytarnej, limfocyty T CD8⁺ komór oka świni nie różniły się od adekwatnego parametru we krwi obwodowej. Dobrze wiadomo, że populacja limfocytarnej świni, w przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt i człowieka, zawiera bardzo duży udział komórek dendrytycznych. Na terenie komór oka świni stwierdzono również występowanie znaczącej populacji tych komórek, jakkolwiek różniły się one istotnie pod względem gęstości cząsteczek CD4 i CD8: we krwi obwodowej dominowały komórki dendrytyczne z wysoką ekspresją CD4, podczas gdy

w komorach oka z wysoką ekspresją CD8. Wyniki te wskazują, że komory oka bydła i świni stanowią element w procesie fizjologicznej migracji limfocytów T CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ i CD4⁺CD8⁺ w organizmie. Najwyraźniej udział tych subpopulacji w populacji limfocytarnej komór oka może się bardzo znacząco różnić pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt. Wyniki wyżej charakteryzowanych badań zostały opublikowane w postaci dwóch artykułów oryginalnych.

Ostatnie badania z tego nurtu dotyczyły obecności limfocytów T w komorach oka psów zdrowych i z zaćmą; dodatkową grupę (referencyjną) stanowiły psy z zapaleniem naczyńówki. W badaniach tych celem było m.in. ustalenie, czy zaćmie starczej towarzyszą zmiany w zakresie zasiedlania komór oka przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, a więc czy towarzyszy jej odpowiedź immunologiczna ze strony limfocytów T. Badania te prowadzono w oparciu o próbki cieczy wodnistej pobieranej w trakcie operacji wewnątrzgałkowych (głównie dotyczy to operacji zaćmy) lub z oczu psów poddawanych eutanazji z przyczyn innych, niż choroby oczu. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują m.in., że: 1) limfocyty CD4⁺ i CD8⁺ znajdują się w komorze oka zdrowych psów, jakkolwiek tylko w ilościach śladowych; 2) rozwój zaćmy może nie być procesem neutralnym immunologicznie, lecz może być powiązanych z rekrutacją limfocytów T CD8⁺ na teren komór oka.

Efektom przeprowadzonych badań jest współautorstwo następujących publikacji poświęconych tej tematyce:

Maślanka T., **Ziółkowska N.**, Ziółkowski H., Małaczewska J. CD25+CD127+Foxp3- Cells Represent a Major Subpopulation of CD8+ T Cells in the Eye Chambers of Normal Mice. PLoS One. 2017; 12: e017002. **MEiN = 40, IF₂₀₂₁ = 2,766**

Maślanka T., Socha P., **Ziółkowska N.**, Dąbrowski M., Małaczewska J., Ziółkowski H. CD4- and CD8-expressing cells found in the bovine and porcine anterior chamber of the eye. Pol J Vet Sci. 2018; 21:293–298. **MEiN =20 , IF₂₀₂₁ = 0,802**

Maślanka T., Ziółkowski H., Garnarcz J., **Ziółkowska N.** CD4- and CD8-expressing cells in the chambers of normal, cataract and uveitic eyes: A comparative study in dogs. Res Vet Sci. 2020; 132:393–399. **MEiN =100 , IF₂₀₂₁ =2,534**

Mój wkład w powstanie tych prac polegał na: zebraniu materiału do badania, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w każdej z powyższych prac szacuję na 10%.

4.3.2.3. Badania nad charakterystyką stanu zapalnego w strukturach oka u kotów z zakaźnym zapaleniem otrzewnej

Zakaźne zapalenie otrzewnej kotów (FIP) jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród młodych kotów. Pomimo intensywnych badań prowadzonych od ponad 30 lat na całym świecie, patogeneza tej letalnej choroby nie została jednoznacznie ustalona. Badaniom poddano gałki oczne (z objawami i bez objawów okulistycznych) pobrane od 15 kotów różnych ras (sfinksy kanadyjskie = 4, persy = 2, europejskie krótkowłose = 9) w wieku od 8 miesięcy do 3 lat, które trafiały do lecznic z zaawansowanymi objawami klinicznymi FIP. Koty ze względu na bardzo zły stan kliniczny i kacheksję zostały poddane eutanazji oraz badaniu sekcijnemu. Pobrane gałki oczne poddano badaniom histologicznym i immunohistochemicznym. W celu potwierdzenia FIP oraz obecności wirusa, zwierzęta poddano badaniu sekcijnemu, a wybrane narządy poddano diagnostyce histopatologicznej i immunochemicznej na obecność antygenów wirusowych oraz zmian histopatologicznych typowych dla tej choroby.

W celu określenia obrazu histopatologicznego zmian, gałki oczne zostały poddane barwieniu HE, a w celu immunochemicznej charakterystyki stanu zapalnego oraz immunofenotypowej identyfikacji komórek zapalnych zastosowano panel barwień immunohistochemicznych wykorzystując następujące klonów przeciwciał: CD3 (marker limfocytów T), CD79a (marker limfocytów B), MAC387 (marker makrofagów), GFAP (marker komórek glejowych), PCNA (marker proliferacji komórek). W celu potwierdzenia obecności wirusa w narządach wewnętrznych oraz oku wykorzystano przeciwciała przeciwko antygenom koronawirusa (FCoV, klon FIPV3-70).

Przeprowadzone badania wykazały, że niezależnie od postaci choroby (mokra, sucha, mieszana) u wszystkich badanych zwierząt zapalenie o różnym natężeniu było zawsze obecne w tęczęwce, ciele rzęskowym, naczyniówce, siatkówce, twardówce oraz spojówce. Nacieki zapalne w nerwie wzrokowym oraz otoczkach nerwu stwierdzono u 9 kotów, a w rogówce u 5 osobników. Ocenę intensywności zapalenia przeprowadzono na podstawie liczenia komórek zapalnych (limfocytów, plazmocytów, makrofagów i erytrofagocytów) i opracowania kryteriów oceny (scoring system). Wyznaczono 5 stopni zapalenia (0° - od 1-3 komórek zapalnych (k.z.) w danej strukturze, 1° - 4-50 k.z., 2° - 51-100; 3° - 100-200; 4° - powyżej 200 k.z.). W dwóch przypadkach stwierdzono obecność typowego zapalenia ziarniniakowego w ciele rzęskowym, charakteryzującego się naciekiem licznych makrofagów z piankową cytoplazmą, otoczonych przez limfocyty. Naciekom komórek zapalnych towarzyszyły inne zmiany patologiczne jak: wysięki zapalne w ciele rzęskowym i siatkówce, uszkodzenia ściany naczyń krwionośnych w spojówce i ciele rzęskowym oraz skrzepy złożone z włókniaka i komórek zapalnych w komorze przedniej oka. Istotną zmianą patologiczną obserwowaną szczególnie w gałkach ocznych o największym zapaleniu było zapalenie żył tęczęwki i twardówki.

Badania immunohistochemiczne wykazały, że dominującym typem komórek w zapaleniach o największym nasileniu są limfocyty B i plazmocyty, co wskazuje z jednej strony na chroniczny charakter zapalenia, z drugiej zaś na znaczący udział odpowiedzi humoralnej w rozwoju zapalenia w oku w przebiegu FIP u kotów. Obecność licznych makrofagów, wykazujących ekspresję kalprotektyny (MAC397) stwierdzono w zapaleniach 3° i 4°, gdzie obserwowano znaczne uszkodzenia elementów bariery krwi – ciecz wodnista, tj. ściany naczyń krwionośnych (żył) oraz nabłonka wyrostków rzęskowych. Ekspresja kalprotektyny w makrofagach świadczyła, że są to komórki, które „świeżo” wniknęły do tkanki. W pozostałych przypadkach (zapalenia 1° i 2°) makrofagi stanowiły mniejszość wśród komórek zapalnych i tylko nieliczne wykazywały ekspresję kalprotektyny. W odróżnieniu od wcześniej prezentowanych wyników badań, sugerujących, że dominującym typem komórek zapalnych w przebiegu FIP są makrofagi, uzyskane wyniki wykazały, że dominującym typem komórek w oku są limfocyty B i plazmocyty, a liczba makrofagów zwiększa się dopiero przy znacznym uszkodzeniu ściany naczyń krwionośnych. Obecność antygenów wirusowych stwierdzono w makrofagach nacieku zapalnego 3° i 4° jedynie u trzech badanych kotów. Wynik niewielkiej ekspresji FCoV w komórkach nacieku zapalnego w oku jest zgodny z wcześniejszymi wynikami badań przeprowadzonymi na innych narządach od kotów z FIP.

Przeprowadzone badania po raz pierwszy ukazały zmiany w ekspresji kwaśnej glikoproteiny włóknikowej (GFAP) w komórkach Müllera siatkówki oka w trakcie stanu zapalnego wywołanego przez FIP. W prawidłowej siatkówce białko to jest obecne tylko w najbardziej wewnętrznych warstwach siatkówki oka (astrocytach oraz końcowych wypustkach komórek Müllera). Badania wykazały zwiększoną ekspresję GFAP w siatkówce oka. Interesującym wynikiem była również ekspresja PCNA (marker proliferacji) w owalnych jądrach zlokalizowanych w warstwie jądrzastej wewnętrznej siatkówki, co sugeruje proliferację komórek Mullera w odpowiedzi na stan zapalny indukowany przez koronawirusa (FCoV). Wyniki niniejszych badań zostały zaprezentowane w formie doniesienia na międzynarodowej konferencji naukowej ECVO w Helsinkach, podczas której poster zdobył nagrodę za najlepsze doniesienie naukowe konferencji.

Wstępne wyniki badań ultrastrukturalnych dotyczące obrazu morfologicznego tej choroby wykazały obecność mikro-zakrzepów w naczyniach żylnych naczyniówki oka oraz nacieki limfocytów w siatkówce oka. Wyniki wstępne z tego zakresu zostały zaprezentowane na światowym kongresie weterynaryjnym WSAVA w Peru w 2022 roku. Ze względu na aktualną sytuację pandemiczną wywołaną przez COVID-19 i duże zainteresowanie infekcjami wywołanymi przez koronawirusy, badania ultrastrukturalne są nadal kontynuowane w Katedrze.

Efektom przeprowadzonych badań jest autorstwo w następującej publikacji:

Ziółkowska N., Paździor-Czapula K., Lewczuk B., Mikulska-Skupień E., Przybylska-Gornowicz B., Kwiecińska K., Ziółkowski H. (2017) Feline Infectious Peritonitis: Immunohistochemical Features of Ocular Inflammation and the Distribution of Viral Antigens in Structures of the Eye. Vet Pathol. 2017; 54:933–944. MEiN =40 , IF₂₀₂₁ =1,795

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

4.3.2.4. Badania z zakresu charakterystyki morfologicznej przełyku i żołądka bobra europejskiego

Badania z tego obszaru rozpoczęłam w trakcie studiów doktoranckich. Bobry europejskie, decyzją Ministra Ochrony Środowiska, odławiano interwencyjnie przez uprawnione osoby z Polskiego Związku Łowiectwa, na obszarze północno-wschodniej Polski (Popielno, stacja Badawcza PAN). Do badań histologicznych i ultrastrukturalnych wykorzystano narządy (żołądki i przełyki) pobrane pośmiertnie od bobra europejskiego (n = 8). Analiza anatomiczna, histologiczna i ultrastrukturalna wykazała unikalne cechy budowy żołądka bobra europejskiego. Najbardziej charakterystycznym elementem budowy żołądka u tego gatunku jest obecność gruczołu ujścia wpustowego żołądka (CCG) tuż za ujściem przełyku, który powstał poprzez inwaginacje błony śluzowej do błony podśluzowej. Obecność podobnego gruczołu stwierdzono dotychczas w żołądku tylko u 7 innych gatunków na świecie, m.in. u wombata, manatów, oposów, łuskowców i koali. Badania histologiczne wykazały, że gruczoł ten budują ciasno upakowane gruczoły żołądkowe właściwe, zbudowane głównie z komórek okładzinowych i głównych. Komórki śluzowe szyjki, w CCG stanowią bardzo mały udział procentowy wynoszący <0,1%, podczas gdy te same komórki w gruczołach żołądkowych właściwych błony śluzowej pozostałej części żołądka stanowią aż 22-32%. Wynik ten sugeruje, że komórki główne obecne w CCG formują się z komórek niezróżnicowanych, podczas gdy w gruczołach żołądkowych właściwych pozostałej części żołądka powstają z komórek śluzowych szyjki. Kolejną fascynującą cechą żołądka bobra europejskiego jest obecność na jego wewnętrznej powierzchni bardzo grubej (ok. 1000 µm) warstwy śluzu oraz nietypowy proces jego formowania. Badania ultrastrukturalne wykazały że proces formowania tego śluzu zachodzi w kilku etapach w których obserwuje się najpierw gromadzenie ziarnistości śluzowych w komórkach nabłonka powierzchniowego, a następnie

ich rozpad z uwolnieniem wydzieliny śluzowej. Podobny mechanizm wydzielania występuje w gruczołach łojowych skóry i określany jest mianem wydzielania holokrynowego, podczas gdy wydzielanie śluzu na powierzchnię błony śluzowej żołądka u większości badanych dotychczas gatunków zwierząt zachodzi poprzez egzocytozę. Proces formowania śluzu przez nabłonek błony śluzowej żołądka bobra jest unikalny i wydaje się być dobrym modelem do badań nad patomechanizmem wrzodów żołądka.

Ze względu na bezpośrednie sąsiedztwo przełyku i żołądka, był on kolejnym narządem poddanym badaniom morfologicznym. Ze względu na fakt, iż dieta bobra europejskiego różni się zasadniczo w zależności od pory roku, celem badań było określenie wpływu rodzaju pokarmu pobieranego w różnych sezonach roku na morfologię nabłonka przełyku. Do badań użyto przełyki pobrane od zwierząt dorosłych oraz płodów latem, jesienią i zimą. Badania histologiczne wykazały obecność na powierzchni błony śluzowej przełyku nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrytego grubą warstwą zrogowaciałą. Warstwa zrogowaciała nabłonka była 2-3-krotnie grubsza w przełykach pobranych zimą niż w przełykach pobranych latem i jesienią. Interesującym jest fakt, że obecność warstwy zrogowaciej na powierzchni tego nabłonka stwierdzono także w przełykach płodów bobra, co wskazuje na to, że proces zrogowacenia nabłonka przełyku nie jest determinowany jedynie rodzajem spożywanego pokarmu, ale jest uwarunkowany genetycznie. Badania histologiczne wykazały że część żywa nabłonka zbudowana jest z kilku warstw komórek (kolczystych, ziarnistych), co wskazuje na duże podobieństwo w budowie tego nabłonka do naskórka. Badania ultrastrukturalne wykazały obecność w komórkach warstwy ziarnistej licznych ciałek wieloblaszkowych i ciałek o strukturze nie blaszkowej, które uczestniczą w tworzeniu warstwy zrogowaciej.

Efektom wyżej wymienionych badań są dwie publikacje naukowe:

Martyniuk K., **Ziółkowska N.**, Hanuszewska-Dominiak M., Szyryńska N., Lewczuk B. Histology and ultrastructure of esophagus in European beaver (*Castor fiber*) displays features adapted to seasonal changes in diet. *Animals*. 2023; 13:635. **MEiN =100 , IF₂₀₂₁ =3,231**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału do badania, wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

Ziółkowska N., Lewczuk B., Petryński W., Palkowska K., Prusik M., Targońska K., Giżejowski Z., Przybylska-Gornowicz B. Light and electron microscopy of the European

beaver (Castor fiber) stomach reveal unique morphological features with possible general biological significance. PLoS One. 2014; 9:e94590. **MEiN =40 , IF₂₀₂₁ =3,234**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu materiału do badania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 45%.

4.3.2.5. Badania nad wpływem podawania niskich dawek zearalenonu i deoksyniwalenolu na budowę histologiczną jelit i wątroby u świń

Układ pokarmowy jest głównym miejscem wchłaniania, metabolizmu i rozpadu mikotoksyn, a przez to jest najbardziej narażony na toksyczne działanie tych substancji oraz ich metabolitów. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu małych dawek (12 µg i 40 µg) zearalenonu (Z) oraz deoksyniwalenolu (D) podawanych *per os* oddzielnie lub łącznie (Z+D), na morfologię poszczególnych odcinków jelita i wątroby u świń, w zależności od czasu ekspozycji na te toksyny. Badania histologiczne i morfometryczne u świń otrzymujących D i D+Z przez okres 6 tygodni wykazały istotne zwiększenie grubości błony śluzowej jelit cienkich i głębokości krypt jelitowych oraz zmniejszony stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt. Badania wykazały także zwiększenie liczby komórek kubkowych w nabłonku kosmków po 1 tygodniu stosowania Z i Z+D oraz po 3 tygodniach ekspozycji na D. Liczba limfocytów w nabłonku kosmków istotnie się zwiększyła względem kontroli po 1 tygodniu ekspozycji na Z, a liczba plazmocytów wzrosła w blaszce właściwej błony śluzowej po 1, 3 i 6 tygodniach ekspozycji na tą mikotoksynę. W przypadku D, zwiększenie liczby limfocytów w nabłonku kosmków obserwowano dopiero po 6 tygodniach ekspozycji, a plazmocytów już od 1 tygodnia ekspozycji na tą mikotoksynę. W grupie świń otrzymującej łącznie Z+D, znaczący wzrost liczby limfocytów w nabłonku kosmków i blaszce właściwej błony śluzowej obserwowano po 6 tygodniach łącznego stosowania mikotoksyn.

Badania ultrastrukturalne i histologiczne wątroby świń otrzymujących Z, D lub Z+D wykazały: 1) zwiększenie grubości tkanki łącznej okołozrazikowej; 2) rozszerzenie naczyń zatokowych wątroby w grupach Z, D, Z+D; 3) przejściowe zmiany w zawartości glikogenu w hepatocytach w grupach Z, D, Z+D; 4) zwiększenie akumulacji żelaza w hepatocytach w grupach Z, Z+D; oraz 5) zmiany w organizacji siateczki śródplazmatycznej w hepatocytach. Wyniki badań sugerują że ekspozycja na małe dawki mikotoksyn takich jak Z i D, zwiększa aktywność komórek układu immunologicznego na terenie jelita cienkiego oraz wpływa na morfologię wątroby u świń.

Autoreferat: dr n. wet. Natalia Ziółkowska

Efektom wyżej wymienionych badań jest współautorstwo w dwóch publikacjach naukowych oraz dwóch rozdziałach w monografiach:

Przybylska-Gornowicz B., Tarasiuk M., Lewczuk B., Prusik M., **Ziółkowska N.**, Zielonka Ł., Gajęcki M., Gajęcka M. The effects of low doses of two fusariumtoxins, zearalenone and deoxynivalenol, on the pig jejunum. A light and electronmicroscopic study. *Toxins*. 2015; 7:4684–4705. **MEiN = 30, IF₂₀₂₁ =3,571**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zebraniu materiału do badania i wykonaniu analiz laboratoryjnych.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Lewczuk B., Przybylska-Gornowicz B., Gajęcka M., Targońska K., **Ziółkowska N.**, Prusik M., Gajęcki M. Histological structure of duodenum in gilts receiving low doses of zearalenone and deoxynivalenol in feed. *Exp Toxicol Pathol*. 2016; 68:157–166. **MEiN =25 , IF₂₀₂₁ =1,795**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pracach związanych z zebraniem materiału i przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Lewczuk B., Przybylska-Gornowicz B., Gajęcka M., Prusik M., **Ziółkowska N.**, Gajęcki M. Wpływ podawania niskich dawek zearalenonu i deoksyniwalenolu w paszy na obraz histologiczny i ultrastrukturę wątroby loszek - wyniki wstępne. W monografii: „Weterynaryjna Higiena Pasz – Niepożądane i Pożądane Dodatki Paszowe”. 2013:161–182.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pracach związanych z zebraniem materiału i przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Przybylska-Gornowicz B., Lewczuk B., Zielonka Ł., **Ziółkowska N.**, Prusik M., Gajęcki M. Obraz mikroskopowy dwunastnicy loszek otrzymujących niskie dawki zearalenonu i deoksyniwalenolu w paszy – wyniki wstępne. W monografii: „Weterynaryjna Higiena Pasz – Niepożądane i Pożądane Dodatki Paszowe”. 2013:233–248.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pracach związanych z zebraniem materiału i przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

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

5.1. Zagraniczne staże naukowe

- 6-cio – miesięczny staż naukowy (w ramach programu POST-DOC finansowany przez Konsorcjum Naukowe KNOW), realizowany w Department of Clinical Sciences and Advanced Medicine, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Filadelfia, USA, 14.02.2018—15.08.2018.
- Krótkoterminowy staż naukowy (w ramach programu POST-DOC finansowany przez Konsorcjum Naukowe KNOW), realizowany w Department of Clinical Sciences and Advanced Medicine, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Filadelfia, USA, 15.11.2019- 15.12.2019.

5.2. Badania naukowe prowadzone na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Pensylwanii w Department of Experimental Retinal Therapies

Ze względu na moje zainteresowania oscylujące wokół badań nad siatkówką, w 2018 roku w ramach programu POST-DOC finansowanego przez KNOW, odbyłam 6-miesięczny staż naukowy w University of Pennsylvania, w Department of Experimental Retinal Therapies (School of Veterinary Medicine). W ramach projektu NIH pt. "*Translational gene therapy for rhodopsin autosomal dominant retinitis pigmentosa*", prowadziłam badania dotyczące klasyfikacji genu *BIRC5* jako potencjalnego czynnika o działaniu neuroprotektynowym w leczeniu dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych siatkówki [*Characterizing the role of survivin (BIRC5) as a potential new neuroprotective strategy for inherited retinal neurodegenerations*]. W trakcie realizacji projektu wykonałam następujące zadania: 1) klonowanie psiego genu *BIRC5* oraz jego transfekcję do kompetentnych komórek nerki psa (MDCK) przy użyciu technik inżynierii genetycznej oraz biologii molekularnej; 2) barwienia immunohistochemiczne hodowli komórek nerki psa MDCK z użyciem przeciwciał przeciwko *BIRC5*; 3) barwienia immunochemiczne preparatów siatkówek pochodzących od zwierząt zdrowych oraz od zwierząt z chorobami dziedzicznymi siatkówki (rdc1- rod-cone dysplasia type 1 i crd2 – cone-rod dystrophy type 2); 4) określanie ekspresji białka *BIRC5* w ekstraktach siatkówek pochodzących od zwierząt zdrowych oraz od zwierząt z chorobami dziedzicznymi siatkówki (rdc1 i crd2) metodą western blottingu; 5) określanie ekspresji mRNA *BIRC5* w preparatach siatkówek psów zdrowych i z chorobami dziedzicznymi siatkówki (rdc1 i crd2) przy użyciu techniki qPCR oraz hybrydyzacji in situ (RNAscope); 6) asystowanie w badaniach *in vivo* przeprowadzanych na psach z chorobami dziedzicznymi siatkówki (rdc1 i crd2)

obejmującymi: iniekcje podsiatkówkowe preparatów zawierających wektor wirusowy AAV-BIRC5 (adeno-associated virus z genem *BIRC5*; oraz badania kliniczne siatkówek psów po iniekcjach przy użyciu elektretinografii (ERG) i optycznej koherentnej tomografii komputerowej (OCT). Pomimo faktu, że wspomniane białko okazało się nieodpowiednie w leczeniu chorób siatkówki, to pobyt i doświadczenie zaowocowało nawiązaniem dalszej współpracy w zakresie chorób siatkówki u psów i kotów.

5.2.1. Badania nad rozwojem i charakterystyką fenotypową i genotypową dystrofii czopków i pręcików u psów (RPGRIP1, CRD)

Podczas pobytu na stażu na Wydziale Weterynarii Uniwersytetu Pensylwanii brałam udział w pracach nad charakterystyką kliniczną i morfologiczną rozwoju dziedzicznej choroby siatkówki u psów, tj. dystrofii czopków i pręcików (RPGRIP1, CRD) jako modelu badawczego dla chorób siatkówki człowieka. Katedra Terapii Eksperymentalnych Siatkówki Wydziału Weterynarii Uniwersytetu Pensylwanii prowadzi zaawansowane badania nad opracowywaniem terapii genowych w leczeniu dziedzicznych chorób siatkówki u ludzi takich jak zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, dystrofia żółtkowa plamki, do rozwoju których przyczyniają się mutacje w konkretnych genach komórek fotoreceptorowych. Badania nad CRD przeprowadzono na 58 psach z mutacją w genie *RPGRIP1*, które poddawaliśmy regularnym badaniom okulistycznym (oftalmoskopii, ERG oraz OCT) w okresie od urodzenia do 9 roku życia, a następnie pobraliśmy ich siatkówki i przeznaczaliśmy do badań molekularnych i morfologicznych. Preparaty siatkówek pobrane do badań ultrastrukturalnych analizowałam przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Badania wykazały, że przebieg choroby był znacznie szybszy w przypadku psów o genotypie Rpgrip/Map9/L3 i obejmował znaczne ścieńczenie warstwy jądrazastej wewnętrznej (ONL) do 1 warstwy jąder i całkowity zanik segmentów zewnętrznych i wewnętrznych fotoreceptorów. W przypadku osobników o genotypie Rpgrip/M9 ścieńczenie warstwy ONL było umiarkowane, występował natomiast zanik w obrębie segmentów zewnętrznych fotoreceptorów przy dobrze zachowanych segmentach wewnętrznych. W przypadku genotypów Rpgrip/L3 siatkówka była najlepiej zachowana i nie obserwowano zmian w obrębie fotoreceptorów.

Efektom prowadzenia badań w tej jednostce naukowej jest współautorstwo w publikacji naukowej:

Ripolles-Garcia A., Murgiano L., **Ziolkowska N.**, Pompeo Marinho F., Roszak K., Iffrig S., Aguirre G.D., Miyadera K. Natural disease history of a canine model of oligogenic RPGRIP1-cone-rod dystrophy establishes variable effects of previously and newly mapped modifier loci. Hum Mol Genet. 2023; Ddad046. **MEiN = 140, IF₂₀₂₁ = 5,121**

Autoreferat: dr n. wet. Natalia Ziółkowska

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pracach związanych z zebraniem materiału, wykonaniem analiz i interpretacją wyników badań ultrastrukturalnych oraz przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

5.2.2. Badania nad charakterystyką fenotypową i genotypową dystrofii żółtkowej plamki (BVMD)

W ramach stażu POST-DOC nawiązałam także współpracę z prof. Kariną Guzewicz (University of Pennsylvania, Department of Experimental Retinal Therapies, School of Veterinary Medicine) i byłam wykonawcą w projekcie naukowym dotyczącym badań nad mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstawy wpływu światła jako czynnika indukującego rozwój retinopatii, jaką jest dystrofia żółtkowa plamki (BVMD), będąca przyczyną ślepoty u ludzi. W ramach tego projektu uczestniczyłam w badaniach klinicznych psów z naturalnie występującą retinopatią BVMD (elektroretinografia, koherentna tomografia komputerowa), wykonywałam badania laboratoryjne (histologiczne, immunocytochemiczne, molekularne) oraz badania ultrastrukturalne. Wyniki uzyskane w trakcie pracy w tej jednostce znajdują się na etapie przygotowania ich do publikacji.

5.2.3. Badania prowadzone we współpracy z Katedrą Neurologii i Neurochirurgii Uniwersytetu Pensylwanii

W trakcie stażu, we współpracy z Katedrą Neurologii i Neurochirurgii (Prof. Charles Vite, DACVIM) rozpoczęłam realizację projektu dotyczącego charakterystyki klinicznej i morfologicznej zmian zachodzących w siatkówce u kotów z lipidową chorobą spichrzeniową Niemann-Pick typu C (NPC). NPC jest śmiertelną chorobą występującą u ludzi i zwierząt, która charakteryzuje się gromadzeniem wolnego cholesterolu m.in w neuronach układu nerwowego, prowadząc do jego uszkodzenia. Wstępne wyniki badań immunocytochemicznych, które przeprowadziłam w tym ośrodku (barwienie z użyciem filipin i BODPIY) wykazały obecność kropli lipidów w komórkach zwojowych siatkówki u kotów genetycznie obciążonych wystąpieniem tej choroby. W celu potwierdzenia badań immunocytochemicznych, aktualnie prowadzone są badania ultrastrukturalne siatkówek kotów z NPC. Badania te będą pierwszymi na świecie badaniami szeroko charakteryzującymi zmiany jakie zachodzą w gałce ocznej w przebiegu tej choroby u kotów.

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne:

- Promotor pomocniczy w rozprawie doktorskiej dr Marceli Petruszewicz- Kosińskiej zatytułowanej „Rozwój powyłęgowy szyszynki indyka – aspekty strukturalne i funkcjonalne”. Uzyskanie stopnia doktora w 2019;
- Zajęcie pierwszego miejsca w ankietach studenckich VI roku studiów stacjonarnych na kierunku Weterynaria w latach (2021/2022) w kategoriach: najlepsza prowadząca zajęcia z przedmiotu fakultatywnego (Okulistyka Weterynaryjna) oraz najlepszy przedmiot fakultatywny (Okulistyka Weterynaryjna).
- Opiekun /naukowy Koła Naukowego Histologów w latach 2014-2023 (wielokrotnie nagradzane referaty Koła)
- Koordynator dydaktyczny przedmiotów: Histologia i Embriologia, Biologia Komórki;
- Realizacja przedmiotów:
 - Biologia Komórki dla studentów I roku na kierunku Weterynaria
 - Histologia i Embriologia dla studentów I roku na kierunku Weterynaria;
- Kierownik przedmiotów dydaktycznych fakultatywnych Okulistyka Weterynaryjna oraz Histofizjologia Oka z elementami patologii dla studentów III i VI roku studiów stacjonarnych na kierunku Weterynaria;
- Rozwój warsztatu dydaktycznego z zakresu okulistyki weterynaryjnej dla studentów 5 i 6 roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (łączna kwota 80 000 zł);
- Przygotowanie materiałów do e-learningu:
 - Opracowanie filmów instruktarzowych z przedmiotu Histologia i Embriologia dla studentów I roku dostępnych na Portalu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

- Opiekun Pracowni Histochemii i Immunohistochemii oraz Pracowni Mikroskopii Konfokalnej w Katedrze Histologii i Embriologii;
- Koordynator wprowadzania i aktualizacji sylabusów przedmiotów realizowanych w Katedrze Histologii i Embriologii (w latach 2013-2020);
- Koordynator planów zajęć dydaktycznych z przedmiotów:
 - Histologii i Embriologia w latach 2013-2020
 - Biologia Komórki w latach 2013-2020
- Członek Rady Dyscypliny Weterynaria w latach 2020-2022;
- Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych:
 - Członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych;

- Członek Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików;
- Członek Brytyjskiego Towarzystwa Okulistycznego BrAVO;
- Członek Międzynarodowego Towarzystwa Okulistycznego ISVO;
- Kierownik projektu finansowanego przez Konsorcjum KNOW dotyczącego rozwoju warsztatu badawczego młodego pracownika nauki (zakup urządzeń i wdrożenie technik hybrydyzacji *in situ* i western blottingu). Czas trwania projektu (2018-2019).
- Recenzent prac naukowych:
 - Recenzje artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, m.in. Cells (IF= 7,66), Frontiers in Neuroanatomy (IF=3,54), Chronobiology International (IF=3,74), Endocrine Connections (IF=3,22), Polish Journal of Veterinary Sciences (IF=0,82), Photochemical & Photobiological Sciences (IF=4,32), Neural Regeneration Research (IF=6,05), International Journal of Molecular Sciences (IF=6,8);
 - Recenzja krajowego projektu badawczego realizowanego w ramach projektu MISTRZ pt. "Analiza porównawcza okolicy oczodołu, gałki ocznej oraz wybranych narządów dodatkowych oka u dziko żyjących kotowatych z rodzaju *Otocolobus*, *Neofelis*, *Panthera* – badania wstępne", jednostka przyznająca finansowanie – Uniwersytet Wrocławski, 2022.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

6.3.1. Publikacje w popularno-naukowych i naukowych czasopismach przeznaczonych dla praktykujących lekarzy weterynarii:

- Ziółkowska N., Prusik M., Ziółkowski H., „Dysplazja siatkówki u psów i kotów – aktualny stan wiedzy”. *Med Weter.* 2012; 68:15–21.
- Ziółkowska N. „Immunologia powierzchniowych struktur gałki ocznej”. *Życie Wet.* 2013; 88:553–557.
- Cisło-Pakuluk A., Ziółkowska N. „Praktyczne aspekty badania neurookulistycznego małych zwierząt”. *Mag Wet.* 2018; 07–08.

6.3.2. Wystąpienia ustne wygłoszone podczas konferencji dla lekarzy weterynarii praktyków oraz dla studentów wydziałów weterynaryjnych i medycznych:

- **Ziółkowska N.** Siatkówka oka – od budowy i funkcji do terapii celowanych. Wykład przeprowadzony w ramach szkolenia okulistycznego organizowanego przez platformę Edu Eye Vet. Wrocław, 10.05.2023.

- **Ziółkowska N.** Okulistyczne urządzenia diagnostyczne w weterynaryjnej praktyce okulistycznej, Wykład dla Studenckiego Koła Naukowego Technik Obrazowania UWM 16.06.2021.
 - **Ziółkowska N.** Okulistyka weterynaryjna a produkty lecznicze. Konferencja "Farmacja weterynaryjna - rola farmaceuty w świecie leków przeznaczonych dla zwierząt" 29.05-30.05.2021. Wykład dla Seminarium Kół Naukowych, GUM, Gdańsk.
 - **Ziółkowska N.** Wrzody rogówki u psów i kotów- diagnostyka, klasyfikacja i leczenie. IVSA, 17.01. 2019.
 - **Ziółkowska N.** Ekspozycja na światło niebieskie powoduje spadek liczby neuronów zwojowych zawierających melanosynę oraz ich włókien nerwowych w siatkówkach szczurów. III Sympozjum „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”; Guzowy Piec, 23-27.09, 2019, str. 76.
 - **Ziółkowska N.** Zapalenie błony naczyniowej u psów i kotów – przyczyny, diagnostyka i leczenie. Konferencja IVSA „Okulistyka w Weterynarii” 23.03.2019.
 - **Ziółkowska N.** Histologiczna i immunohistochemiczna charakterystyka zapalenia gałki ocznej u kotów z zakaźnym zapaleniem otrzewnej (FIP). I Sympozjum: Zdrowe Zwierzę-Bezpieczna Żywność oraz XI Sympozjum: Genetyczne, Fizjologiczne i Środowiskowe Uwarunkowania Rozrodu i Zdrowia Zwierząt oraz Bezpieczeństwa i Jakości Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, KNOW Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący, Konsorcjum Naukowe "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", 11-13.06.2017, Wierzba.
 - **Ziółkowska N.** Wskazania i przeciwwskazania do stosowania NLPZ I SLPZ w terapii wybranych chorób oczu u psów i kotów. XXV Międzynarodowy Kongres Medycyny Weterynaryjnej Małych Zwierząt PSLWMZ. 20-22.10.2017, Łódź.
 - **Ziółkowska N.** Wybrane zagadnienia z diagnostyki i terapii chorób okulistycznych u zwierząt. Część I. Etapy badania klinicznego oczu zwierząt. IVSA, 4.11.2017.
- 7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**
- 7.1. Zrealizowane projekty badawcze.**
- Wykonawca w projekcie badawczym OPUS pt. „Wpływ delekcji RAGE/Diaph1 na zmniejszenie uszkodzenia siatkówki i nerwu wzrokowego w cukrzycy”. NCN DEC-2022/47/B/NZ5/0089 (2023-2026).

- Kierownik projektu badawczego Miniatura 1 pt. „Analiza morfologiczna siatkówki szczurów eksponowanych na działanie światła niebieskiego o wysokiej energii HEV”, NCN DEC-2017/01/X/NZ4/00838. (2018-2019).
- Kierownik projektu badawczego pt. „Immunohistochemiczna i ultrastrukturalna charakterystyka zapalenia gałki ocznej u kotów z zakaźnym zapaleniem otrzewnej (FIP) jako element badań nad patogenezą choroby” finansowanego ze środków Konsorcjum Naukowego KNOW, No. 05-1/KNOW2/2015. (2018-2019).
- Wykonawca w projekcie badawczym MNiSW pt. „Procesy wydzielnicze i mechanizmy ich regulacji w szyszynkach wybranych gatunków ptaków blaszkodziobych” (Nr. N N308 069937).
- Wykonawca w projekcie badawczym rozwojowym MNiSW pt. „Określenie wpływu eksperymentalnej mikotoksykozy fuzaryjnej na wybrane wskaźniki diagnostyczno-morfologiczne przewodu pokarmowego świni” (Nr. NR 12008010) w ramach zadania „Badania histologiczne, immunohistochemiczne oraz ultrastrukturalne wybranych narządów przewodu pokarmowego (jelita cienkiego, jelita grubego oraz wątroby) zwierząt żywionych paszą z dodatkiem zearalenonu i deoksyniwalenolu”.

7.2. Wyróżnienia

- Stypendium Ministra Edukacji i Nauki przyznane za wybitne osiągnięcia naukowe na okres 3 lat (2020-2023).
- Wyróżnienie PTNW i nagroda III stopnia w kategorii za najlepszą publikację oryginalną zamieszczoną w czasopiśmie zagranicznym dla młodego /do 35 roku życia/ pracownika naukowego w Konkursie Doroczna Nagroda PTNW:
Ziółkowska N., Lewczuk B., Petryński W., Palkowska K., Prusik M., Targońska K., Gizejewski Z., Przybylska-Gornowicz B. Light and electron microscopy of the European beaver (*Castor fiber*) stomach reveal unique morphological features with possible general biological significance. PLoS One. 2014; 9:e94590.
- Nagroda za najlepsze doniesienie naukowe podczas Kongresu organizowanego przez European College of Veterinary Ophthalmologists (ECVO), Helsinki, 28-31 maj 2015: Ziółkowska N., Lewczuk B., Paździor-Czapula K., Mikulska-Skupień E. ”Morphological features of okular inflammation and distribution of Vidal antigens in the ocular tissues of cats with feline infectious peritonitis (FIP). Vet. Ophtalmol. 18 (5) E4-E17.
- Nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (I stopnia) za osiągnięcia w dziedzinie naukowej, UWM, Olsztyn, 1.12.2018.

- Zajęcie I miejsca za wygłoszenie referatu pt. „Badania *in vitro* nad mechanizmami regulującymi wydzielanie melatoniny w szyszynce kaczki domowej”, Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, 15-16.05.2012, Olsztyn.
- Najlepszy plakat sesji posterowej XIV Kongres PTNW, 15.09.2012, Wrocław.

7.3. Szkolenia, kursy

- Szkolenie podyplomowe „Ophthalmology I”, European School For Advanced Studies ECVO, 23.06.2014-4.07.2014, Luksemburg (Luksemburg);
- Szkolenie podyplomowe „Ophthalmology II”, European School For Advanced Studies ECVO, 27.06.2016-1.07.2016, Tuluza (Francja);
- Kurs z elektrofizjologii siatkówki: „The Science and The Practice of Clinical Electroretinography”, 5-6.12.2009, Hennigsdorf (Niemcy).
- Szkolenie „Mikroskopia wirtualna w nauczaniu histologii i histopatologii” w ramach projektu „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie”, 17-20.02.2015, Olsztyn;
- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, 12-16.10.2015, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PolLASA;

Wartości parametrów naukometrycznych całego dorobku naukowego

- ❖ Łączna liczba punktów MNiSW/MNiE^{1,2} wszystkich publikacji: **1661**
- ❖ Łączna liczba punktów MNiSW/MNiE publikacji z pierwszym autorstwem: **729**, w tym:
 - **380** pkt za publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia,
 - **349** pkt za pozostałe publikacje.
- ❖ Łączny współczynnik oddziaływania^{2,3} [Impact factor (IF)] wszystkich publikacji: **74,672**
- ❖ Łączny IF publikacji z pierwszym autorstwem: **31,874**, w tym:
 - **16,12** za publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia,
 - **15,754** za pozostałe publikacje.

Źródło	Całkowita liczba cytowań	Liczba cytowań bez autocytowań	Indeks Hirsch'a
Web of Science (Core Collection)²	237	216	8

Autoreferat: dr n. wet. Natalia Ziółkowska

Scopus⁴	255	231	8
Google Scholar⁴	377	-	10

¹Punktację MNiSW/MNiE podano zgodnie z rokiem publikacji artykułu, tj. według komunikatu MNiSW/MNiE obowiązującego dla danego roku/lat.

^{2,4}Dane podano zgodnie z raportem bibliometrycznym przygotowanym przez Oddziały Informacji Naukowej Biblioteki Uniwersyteckiej UWM w Olsztynie 12.05.2023.

³IF podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułów opublikowanych w roku 2022 i 2023 r. podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2021.

⁴Podano w oparciu o dane znajdujące się w bazie Google Scholar na dzień 10.05.2023

Podpis wnioskodawcy

Ziolkowska Natalie