Streszczenie

Zapalenie macicy (*endometritis*), zarówno o podłożu zakaźnym, jak i nie zakaźnym, jest jednym z najczęstszych stanów patologicznych układu rozrodczego samic zwierząt domowych, w szczególności zwierząt gospodarskich. Generuje ono znaczące straty ekonomiczne, jak również doprowadza do obniżenia wskaźników rozrodczych oraz znacznie zwiększa koszty leczenia. W przypadku kobiet może doprowadzić do nieodwracalnego upośledzenia płodności. Dodatkowo zapaleniu macicy towarzyszy zapalenie gruczołu mlekowego połączone z bezmlecznością, co w przypadku świń przekłada się na problemy z karmieniem prosiąt.

Patogeneza tego schorzenia jest złożona i wiąże się ze wzrostem produkcji przez zapalną macicę licznych substancji mających charakter prozapalny. Należy zaliczyć do nich interleukiny IL-1β, IL-6, IL-8, prostaglandyny – PGF2α, PGE2, a także leukotrieny - LTB4 oraz LTC4. Długo trwający proces zapalny prowadzi do zmian w strukturach nerwowych, zarówno wewnątrzmacicznych jak również w zewnątrzpochodnych zwojach nerwowych unerwiających macicę. Jednym z głównych źródeł zewnątrzpochodnego unerwienia macicy jest zwój przyszyjkowy (PCG, *paracervical ganglion*). Cechą charakterystyczną tego zwoju jest to, że zawiera on zarówno neurony współczulne jak i przywspółczulne. W niniejszej pracy zbadano wpływ stanu zapalnego macicy wywołanego domaciczną inokulacją zawiesiny bakterii z grupy *Escherichia Coli* na fenotyp neuronów zwoju przyszyjkowego. Badania przeprowadzono na dojrzałych płciowo lochach. W celu dokładnego wyznakowania populacji neuronów obecnych w zwoju PCG unerwiających macicę zastosowano technikę wstecznego znakowania neuronów z wykorzystaniem znacznika neuronalnego Fast Blue (FB).

Badania wykonano na 3 grupach zwierząt. Grupie kontrolnej (n=4) oraz dwóch grupach eksperymentalnych. Pierwsza z nich (n=4) otrzymała domaciczną iniekcję zawiesiny bakterii *E. coli*, druga natomiast (n=3) iniekcję domaciczną roztworu płynu fizjologicznego (0,9% NaCl). Znacznik neuronalny FB został podany zwierzętom ze wszystkich grup do prawego i lewego rogu macicy. Dwadzieścia osiem dni po iniekcji FB zwierzętom z grupy kontrolnej wykonano ponowną laparotomię. W tym samym czasie zwierzęta z grupy *E. coli* otrzymały domaciczną inokulację zawiesiny bakteryjnej, natomiast zwierzęta z drugiej grupy doświadczalnej otrzymały domaciczną iniekcję płynu

fizjologicznego. Po upływie 8 dni od operacji (36 dzień doświadczenia) wszystkie zwierzęta zostały poddane eutanazji. Do dalszych badań histopatologicznych oraz immunofluorescencyjnych pobrane zostały szyjki macicy wraz z więzadłem szerokim macicy.

W niniejszej pracy zastosowano metodę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych przeciwko wybranym substancjom biologicznie czynnym oraz histochemiczną metodę Karnovsky'ego–Rootsa w celu wykazania aktywności acetylocholinoesterazy. Dodatkowo wykonano badanie histopatologiczne macicy, które potwierdziło wystąpienie stanu zapalnego macicy. W PCG grupy zwierząt otrzymujących iniekcję *E. coli* odnotowano zmniejszenie całkowitej ilości neuronów FB pozytywnych w stosunku do grupy kontrolnej i grupy ziniekcją płynu fizjologicznego. W celu ustalenia zmienności fenotypowej neuronów PCG o charakterze współczulnym w niniejszej pracy jako znacznik wykorzystano β–hydroksylazę dopaminy (DβH), dodatkowo określając kolokalizację neuronów DβH-pozytywnych z wazoaktywnym peptydem jelitowym (VIP), neuropeptydem NPY (NPY), somatostatyną (SOM) oraz neuronalną izoformą syntazy tlenku azotu (nNOS). Analiza skrawków w mikroskopie fluorescencyjnym wykazała wzrost populacji neuronów o następującym fenotypie: DβH+/VIP+, DβH+/NPY+, DβH+/SOM+ oraz DβH+/nNOS+. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie ilości neuronów VIP-, SOM- jak również nNOS-pozytywnych w populacji neuronów nieadrenergicznych, jak również spadek neuronów wykazujących jedynie ekspresję DβH.

W celu wyznakowania populacji neuronów przywspółczulnych zastosowano przeciwciała skierowane przeciwko pęcherzykowemu transporterowi acetylocholiny (VAChT). Jako kotransmitery acetylocholiny w neuronach przywspółczulnych, w niniejszej pracy badano koekspresję somatostatyny (SOM), wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), neuronalnej izoformy syntazy tlenku azotu (nNOS) oraz galaninę (GAL). Jako skutek eksperymentalnego zapalenia macicy zaobserwowano wzrost populacji neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego o fenotypie VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP-, VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM- VAChT+/GAL- oraz VAChT+/nNOS-. Dodatkowo w grupie *E. coli* odnotowano pojawienie się populacji zarówno cholinergicznej, jak i niecholinergicznej syntetyzującej GAL, jak również wzrost populacji niecholinergicznych neuronów VIP-, SOM- oraz nNOS-pozytywnych. Natomiast liczba cholinergicznych neuronów immunoreaktywnych wobec nNOS w badanym zwoju przyszyjkowym uległa

zmniejszeniu w wyniku stanu zapalnego macicy. Dodatkowo opisywany stan patologiczny spowodował zmniejszenie ilości neuronów zawierających acetylocholinoesterazę.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy dostarczają dokładnych danych co do zmienności fenotypowej neuronów współczulnych i przywspółczulnych zwoju przyszyjkowego unerwiających macicę dojrzałej płciowo lochy pod wpływem domacicznej inokulacji zawiesiny bakterii z grupy *E. coli.* Wyniki te wskazują, że neurony PCG unerwiające macicę świni pod wpływem zmian wywołanych infekcją zmieniają swoje kodowanie chemiczne. Zmianie tej towarzyszy spadek całkowitej liczby neuronów zwoju przyszyjkowego zaopatrujących macicę.