Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Fizjologii Klinicznej

PRACA DOKTORSKA

lek. wet. Bartosz Miciński

Wpływ stanu zapalnego macicy wywołanego inokulacją bakterii E. coli na kodowanie chemiczne wyznakowanych neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego u świni domowej

Promotor:

prof. dr hab. Jarosław Całka

Promotor pomocniczy:

dr hab. Michał Bulc, prof. UWM

Olsztyn, 2022

Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi pracy
Prof. dr hab. Jarosławowi Całce
za opiekę naukową, poświęcony czas,
oraz nieocenione wsparcie.

Pragnę podziękować
Prof. dr hab. Barbarze Janie
za przychylność, życzliwość i wsparcie.

Serdecznie dziękuję
Promotorowi pomocniczemu
Dr hab. Michałowi Bulc, prof. UWM
za udzieloną pomoc, cenne wskazówki
oraz okazaną życzliwość.

Pragnę wyrazić wdzięczność
Pracownikom
Katedry Fizjologii Klinicznej
za wszelką pomoc.

Pracę doktorską stanowi cykl dwóch artykułów oryginalnych:

1. Miciński B.; Jana B.; Całka J.

Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Vet Res. 2022 Sep 10;18(1):342. doi: 10.1186/s12917-022-03406-1. (IF **2.792**)

2. Miciński B.; Jana B.; Całka J.

Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts. Animals (Basel). 2022 Jun 29;12(13):1676. doi: 10.3390/ani12131676. (IF **3.231**)

Koszty badań i publikacji sfinansowano w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019-2022, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12 000 000 złotych.

SPIS TREŚCI

1. Streszczenie 5

2. Abstract 8

3. Wykaz skrótów 10

4. Wstęp 12

5. Cel pracy 16

6. Materiały i metody 17

6.1 Zwierzęta doświadczalne 17

6.2 Procedury operacyjne 17

6.2.1 Premedykacja i znieczulenie ogólne 17

6.2.2 Techniki operacyjne 18

6.2.3 Pobranie materiału do badań 19

6.3 Techniki barwień immunofluorescencyjnych i immunohistochemicznych 20

6.3.1 Barwienia immunofluorescencyjne 20

6.3.2 Barwienia immunohistochemiczne 20

6.3.3 Testy specyficzności 21

6.4 Analiza mikroskopowa obrazów 21

6.5 Analiza statystyczna 22

7. Wyniki 25

7.1 Określenie liczby i dystrybucji wstecznie wyznakowanych neuronów zaopatrujących macicę na terenie zwoju PCG 25

7.2 Określenie liczby neuronów zwoju PCG unerwiających macicę świni, immunoreaktywnych wobec DβH, SOM, VIP, NPY i nNOS 26

7.3 Określenie liczby neuronów na terenie zwoju PCG unerwiających macicę świni immunoreaktywnych wobec VAChT, SOM, VIP, GAL i nNOS 33

7.4 Określenie ilości neuronów zawierających AChE w zwoju PCG 39

8. Dyskusja 40

9. Wnioski 48

10. Literatura 50

11. Artykuły wraz z oświadczeniami autorów 59

1. 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.

2. Abstract

Endometritis, of both infectious and non-infectious origin, is one of the most common pathological conditions in the reproductive system of females, especially farm animals. It generates significant economic losses and leads to a reduction in reproductive indicators and significantly increases the cost of treatment. In case of women, it can lead to irreversible impairment of fertility. Additionally, the inflammation of the uterus is accompanied by mastitis combined with agalactia, which in the case of pigs translates into problems with feeding piglets.

The pathogenesis of this disease is complex and associated with an increase in the production of numerous pro-inflammatory substances by the inflamed uterus. These include the interleukins IL-1β, IL-6, IL-8, prostaglandins - PGF2α, PGE2, as well as leukotrienes - LTB4 and LTC4. The long-lasting inflammatory process leads to changes in the neural structures, both intrauterine as well as extrinsic ganglia innervating the uterus. One of the main sources of exogenous uterine innervation is the paracervical ganglion (PCG). The main characteristic of this ganglion is that it contains both sympathetic and parasympathetic neurons. In this study, the influence of uterine inflammation caused by intrauterine inoculation of a suspension of *Escherichia Coli* bacteria on the phenotype of paracervical ganglion neurons was investigated. The research was carried out in sexually mature sows. In order to accurately label the population of neurons present in the PCG innervating the uterus, the technique of retrograde neuronal tracing using the Fast Blue neuronal marker (FB) was used.

The tests were performed on 3 groups of animals. Control group (n = 4) and two experimental groups. The first (n = 4) of them received an intrauterine injection of a suspension of *E. Coli* bacteria, whereas the second (n = 3) was treated with the intrauterine injection of a physiological solution (0.9% NaCl). The FB neuronal tracer was administered to the animals of all groups into the right and left uterine horns. After a period of 28 days, the control animals underwent another laparotomy. At the same time, the animals from the *E. Coli* group received the aforementioned intrauterine inoculation of the bacterial suspension, while the animals from the second experimental group received an intrauterine injection of physiological fluid. Eight days after surgery (experiment day 36), all animals were euthanized. The cervix together with the broad ligament of the uterus were collected for further histopathological and immunofluorescence examinations.

In this study, the method of double immunofluorescence staining with the use of primary antibodies against selected biologically active substances and the histochemical Karnovsky-Roots method to demonstrate the activity of acetylcholinesterase were used. Additionally, a histopathological examination of the uterus was performed, which confirmed uterine inflammation. In the group of animals injected with *E. coli*, there was a reduction in the total amount of FB-positive neurons relative to the control group and the group with physiological fluid injection. In order to determine the phenotypic variability of sympathetic neurons, in this study, dopamine β-hydroxylase (DβH) was used as a marker, additionally determining the collocation of DβH-positive neurons with vasoactive intestinal peptide (VIP), NPY neuropeptide (NPY), somatostatin (SOM) and neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS). Analysis of the sections under fluorescence microscope showed an increase in the population of neurons with the following phenotype: DβH+/VIP+, DβH+/NPY+, DβH+/ SOM+ and DβH+/nNOS+. In addition, a decrease in the number of VIP, SOM and nNOS-positive neurons was observed in the population of the non-adrenergic neurons, as well as a decrease in neurons expressing only DβH. Antibodies against the vesicular acetylcholine transporter (VAChT) were used to label the population of parasympathetic neurons. Somatostatin (SOM), vasoactive intestinal peptide (VIP), neuronal nitric oxide synthase isoform (nNOS) and galanin (GAL) were used as co-transmitters of parasympathetic neurons in this study. The experimental inflammation of the uterus resulted in an increase in the population of uterine paracervical ganglion neurons with the phenotype VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP-, VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM-VAChT+/GAL- and VAChT+/nNOS-. In addition, a *de novo* appearance of both cholinergic and non-cholinergic GAL synthesizing neuronal population, as well as an increase in the population of non-cholinergic VIP-, SOM- and nNOS-positive neurons was noted in the *E. coli* group. In contrast, the cholinergic neurons immunoreactive against nNOS decreased as a result of uterine inflammation. Additionally, as a result of inflammation of the uterus, a decrease in the number of neurons containing acetylcholinesterase was observed.

The obtained results provide, for the first time, accurate data on the variability of the phenotype of the sympathetic and parasympathetic neurons of the paracervical ganglion innervating the uterus of a sexually mature sow under the influence of intrauterine inoculation of a suspension of *E. coli* bacteria. These results confirm that the nervous system, as a result of inflammatory changes, undergoes functional adaptation to the unfavorable factors.

3. Wykaz skrótów

AChE – acetylocholinoesteraza

APG – zwój miedniczny przedni

BSA – albumina surowicy bydlęcej

CaMG – kompleks zwoju krezkowego tylnego

ChAT – acetylotransferaza cholinowa

DRG – zwój rdzeniowy korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych

DβH - β-hydroksylaza dopaminy

E. coli – *Escherichia coli*

ERα – receptor estrogenowy α

FB – Fast Blue

GAL - galanina

IL-1β – interleukina 1 beta

IL-6 – interleukina 6

IL-8 – interleukina 8

iso-OMPA - tetraizopropylopirofosforamid

LTB4 – leukotrien B4

LTC4 – leukotrien C4

NA - noradrenalina

NANC – nieadrenergiczny, niecholinergiczny

nNOS – neuronalna izoforma syntazy tlenku azotu

NO – tlenek azotu

NPY – neuropeptyd Y

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PCG – zwój przyszyjkowy

PGE2 – prostaglandyna E2

PGF2α – prostaglandyna F2α

SChG – zwoje pnia współczulnego

SOM – somatostatyna

SP – substancja P

TH – hydroksylaza tyrozyny

TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α

VAChT – pęcherzykowy transporter acetylocholiny

VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy

4. Wstęp

Macica unerwiona jest przez włókna nerwowe, których ciała komórkowe znajdują się poza ścianą tego narządu. Unerwienie to określane jest jako zewnątrzpochodne. W przypadku macicy unerwiające ją włókna nerwowe swoje perykariony rozmieszczone mają w różnych zwojach autonomicznego układu nerwowego, zarówno współczulnych, przywspółczulnych jak i czuciowych. Zastosowanie technik wstecznego znakowania neuronów z wykorzystaniem różnych znaczników, wśród których możemy wymienić dwuchlorowodorek trans-1-(5-amidyno-2-benzofiranyl)-2-(6-amidyno-2-indolyl)-etylenu, który ze względu na kolor fluorescencji, jak również szybki czas wędrówki wzdłuż wypustek nerwowych nazywany jest Fast Blue (FB), umożliwiło dokładną lokalizację zewnątrzpochodnych źródeł unerwienia macicy. Metoda ta ułatwia również poznanie dokładnego fenotypu chemicznego neuronów macicznych. Jednym z głównych zwojów autonomicznego układu nerwowego, w obrębie którego zidentyfikowano neurony uczestniczące w unerwieniu macicy jest zwój przyszyjkowy (PCG). Zwój ten jest zlokalizowany po obu stronach więzadła szerokiego macicy w okolicy połączenia pochwy z szyjką macicy. Anatomicznie zwój ten stanowi część większego splotu miednicznego, który unerwia narządy moczowo-płciowe [Keast, 1995, 1999; Wąsowicz, 2002]. Cechą charakterystyczną komórek nerwowych tworzących PCG jest to, że współtworzą go zarówno neurony współczulne jak i przywspółczulne. Dodatkowo na terenie zwoju znajduje się niewielka populacja neuronów nieadrenergicznych, niecholinergicznych (NANC) [Keast i in., 1995; Majewski, 1997]. Głównym markerem immunocytochemicznym neuronów cholinergicznych zarówno w ośrodkowym jak i w obwodowym układzie nerwowym jest pęcherzykowy transporter acetylocholiny (VAChT) oraz acetylotransferaza cholinowa (ChAT) [Bell, 1968; Wąsowicz i in., 1998]. Obecność tych substancji została wykazana w zwoju przyszyjkowym szczura, kota, kawii domowej oraz świni [Bell, 1968; Wąsowicz i in., 1998; Papka i in., 1999]. Natomiast adrenergiczny charakter zwoju przyszyjkowego został potwierdzony immunoreaktywnością neuronów zwoju PCG wobec klasycznych markerów współczulnych takich jak noradrenalina (NA), hydroksylaza tyrozyny (TH) oraz β - hydroksylaza dopaminy (DβH) [Mitchell, 1993; Keast i in., 1995]. Dodatkowo zastosowanie techniki podwójnych barwień immunofluorescencyjnych pozwoliło na określenie współwystępowania różnych substancji biologicznie aktywnych zarówno w neuronach cholinergicznych jak i adrenergicznych. Do najważniejszych możemy zaliczyć wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), neuropeptyd Y (NPY), galaninę (GAL), somatostatynę

(SOM), neuronalną izoformę syntazy tlenku azotu (nNOS) czy substancję P (SP). [Alm i in., 1980; Schultzberg I in., 1983; Gu i in., 1984; Inyama I in., 1985; Garfield, 1986; Mitchell, 1993; Podlasz I Wąsowicz, 2008]. Neurony zlokalizowane w obrębie PCG, zarówno cholinergiczne jak i adrenergiczne wysyłają liczne wypustki nerwowe do macicy. Obecność włókien nerwowych w ścianie macicy jest szczególnie gęsta w jej warstwie mięśniowej oraz w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, gdzie tworzą one charakterystyczne żylakowatości [Papka i in., 1995; Richeri i in., 2002; Meller i in., 2016]. Włókna te pełnią różnorodne funkcje w procesach fizjologicznych zachodzących w macicy. Między innymi uczestniczą one w regulacji przepływu krwi w naczyniach macicznych poprzez regulację ich światła, regulują aktywność skurczową macicy oraz procesy sekrecyjne w gruczołach macicznych. Należy podkreślić, że funkcja układu nerwowego regulującego czynności macicy zmienia się w zależności od fazy cyklu rujowego, jak również podlega istotnym zmianom w czasie ciąży [Łakomy i in., 1984; Alm i in., 1986, 1988].

Jednym z najczęściej występujących procesów patologicznych dotyczącym macicy jest proces zapalny obejmujący przede wszystkim błonę śluzową macicy, dlatego w patologii klinicznej określany jest on jako *endometritis* [De Winter i in., 1992; Wesselmann i in., 1998]. Należy dodać, że zapalenie to może obejmować również warstwę mięśniową tego narządu. Schorzenie to, szczególnie w hodowli wielkostadnej bydła czy trzody chlewnej, stanowi poważny problem kliniczny, który dodatkowo generuje wysokie koszty związane z leczeniem, karencją oraz powoduje poważne zaburzenia w rozrodzie zwierząt prowadząc do spadków wskaźników rozrodczych i częstej eliminacji zwierząt z hodowli [De Winter i in., 1995; Robertson i in., 2007; Tummaruk i in., 2010]. Zapalenie błony śluzowej macicy może rozwijać się w odpowiedzi na niezakaźne, jak również zakaźne czynniki głównie pochodzenia bakteriologicznego. Schorzenie to najczęściej pojawia się po porodzie, będąc konsekwencją nieprawidłowego procesu inwolucji macicy, ale może również wystąpić po sztucznej inseminacji oraz kryciu naturalnym [De Winter i in., 1996]. W patogenezie tego procesu mamy często do czynienia z silną reakcją ze strony układu immunologicznego, co skutkuje znacznym wzrostem syntezy licznych czynników o charakterze prozapalnym takich jak interleukiny (IL-1β, IL-6, IL-8), prostaglandyny (PGF2α, PGE2) czy leukotrieny (LTB4, LTC4) [Lewis, 2004; Jana i in., 2007].

Układ nerwowy na każdym poziomie rozwoju i szczeblu organizacji charakteryzuje się zmiennością adaptacyjną w zależności od oddziaływujących na niego czynników zarówno fizjologicznych jak i licznych stanów patologicznych. W neurofizjologii zjawisko to

określane jest plastycznością neuronalną. Istotą tego procesu jest przede wszystkim zmiana fenotypu komórki nerwowej przejawiająca się zmianą w syntezie substancji biologicznie czynnych. W przebiegu tego procesu może dochodzić zarówno do wzrostu, jak również zmniejszenia ilości produkowanych przez neuron neurotransmiterów i kotransmiterów [Jana i in., 2007]. Dotychczasowe badania wykazały, że wiele stanów patologicznych oraz fizjologicznych w obrębie układu rozrodczego, w tym w macicy, prowadzi do istotnych zmian w układzie nerwowym, zarówno wewnątrz jak i zewnątrzpochodnym unerwiającym poszczególne narządy układu rozrodczego. Poprzednie badania wykazały, że ekspresja neuroprzekaźników we włóknach nerwowych obecnych w ścianie macicy zmienia się w przebiegu ciąży, jak również zależnie od fazy cyklu rujowego [Łakomy i in., 1986; Alm i in., 1988; Zoubina i in., 1998; Zoubina i Smith, 2000]. Również proces zapalny macicy powoduje liczne zmiany w układzie nerwowym w obrębie tego narządu [Meller i in., 2016]. Wiedza na temat zmian w kodowaniu chemicznym neuronów zewnątrzpochodnych unerwiających macicę jest niepełna i poznana jedynie u nielicznych gatunków zwierząt. Badania przeprowadzone na szczurach z zapaleniem macicy wykazały wzrost ekspresji substancji P w neuronach czuciowych zwojów rdzeniowych (DRG). Podobne wyniki uzyskano u świni, gdzie proces zapalny doprowadził do zmian w ekspresji substancji czuciowych w obrębie DRG [Li i in., 2008; Meller i in., 2016; Bulc i in., 2019]. Powyższe zmiany odpowiedzialne są za występowanie objawów bólu trzewnego, który towarzyszy stanom zapalnym macicy. Należy podkreślić, że w przypadku stanu zapalnego macicy dochodzi do redukcji liczby neuronów unerwiających macicę zarówno w zwojach czuciowych, jak również w zwoju kreskowym tylnym [Bulc i in., 2019; Jana i Całka, 2020a]. Przytoczone dane nie odnoszą się do reakcji na stan zapalny neuronów cholinergicznych i adrenergicznych zlokalizowanych w PCG. Należy dodać, że jedną z metod immunohistochemicznych, która umożliwia potwierdzenie zarówno cholinergicznego charakteru neuronów, jak również wpływu stanu zapalnego macicy na ich liczebność jest zmodyfikowana metoda Karnovsky'ego-Rootsa [Karnovsky i Roots, 1964]. Zastosowanie tej metody umożliwia uwidacznianie aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) – powszechnie używanego wskaźnika funkcji cholinergicznych w tkankach mózgowych [Silver, 1974; Fischer i in., 1993]. Jednocześnie ze względu na swoją swoistość barwienie to nie wykazuje powinowactwa do włókien oraz komórek nerwowych zaliczanych do części współczulnej autonomicznego układu nerwowego. W niniejszej pracy zastosowano powyższą metodę w celu potwierdzenia cholinergicznego charakteru neuronów PCG unerwiających macicę. Metoda ta umożliwia również określenie procentowego stopnia

uszkodzenia neuronów przywspółczulnych zwoju przyszyjkowego pod wpływem zapalenia macicy.

Wykonane w niniejszej pracy badania stanowią uzupełnienie stanu wiedzy dotyczącego zmian w kodowaniu chemicznym neuronów zewnątrzpochodnych zaopatrujących macicę. Dodatkowo, warto zaznaczyć, iż świnia jest coraz częściej wykorzystywana w badaniach biomedycznych, w tym również w badaniach układu rozrodczego, stając się lepszym modelem doświadczalnym niż gryzonie. Ponadto, dzięki znacznemu podobieństwu organizmu świń do organizmu człowieka szczególnie pod względem: budowy anatomicznej, procesów fizjologicznych i rozwoju embriologicznego, uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą w badaniach patologii macicy ludzkiej [Verma i in., 2011; Swindle i in., 2012]. Mogą się one przyczynić do lepszego zrozumienia procesów zapalnych macicy kobiety.

5. Cel pracy

Na cel pracy składały się:

I. Określenie sposobu rozmieszczenia na obszarze zwoju wstecznie wyznakowanych neuronów zwoju przyszyjkowego zaopatrujących macicę u dojrzałej lochy. Określenie różnic w ilości neuronów oraz ich wewnątrzzwojowej lokalizacji pomiędzy prawym, a lewym zwojem PCG.

II. Określenie zmienności ilościowej we wstecznie wyznakowanych neuronach prawego i lewego zwoju PCG w odpowiedzi na eksperymentalnie wywołane zapalenie macicy.

III. Określenie wzoru kodowania chemicznego neuronów współczulnych i przywspółczulnych we wstecznie wyznakowanych neuronach zwoju PCG oraz zmienności fenotypu tych neuronów w odpowiedzi na stan zapalny macicy. W przypadku populacji neuronów współczulnych wykonanie podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko DβH (znacznik neuronów współczulnych) oraz SOM, VIP, NPY i nNOS. W celu określenia populacji neuronów przywspółczulnych wykonanie podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko VAChT (znacznik neuronów przywspółczulnych) oraz SOM, VIP, GAL i nNOS.

IV. Określenie ilości neuronów PCG zaopatrujących macicę, dodatnich dla acetylocholinoesterazy (AChE) oraz ich zmienności ilościowej w reakcji na sztucznie wywołany stan zapalny macicy.

6. Materiały i metody

6.1 Zwierzęta doświadczalne

Wszystkie procedury związane z przed- i pooperacyjnym utrzymywaniem zwierząt, jak również z wykonaniem opisanych poniżej doświadczeń, odbywały się zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (Uchwała LKE 65/2015).

Badania przeprowadzono na 11 dojrzałych płciowo mieszańcach loszek w wieku 7-8 miesięcy i o masie ciała pomiędzy 90–120 kg, kupionych w fermie trzody chlewnej w miejscowości Wronie (Wronie-Pig Sp. z o.o. Grupa Producentów Trzody Chlewnej, 87-200 Wronie). Loszki wykazywały oznaki behawioralnej rui, co zostało potwierdzone przy użyciu knura testowego. Zwierzęta zostały losowo podzielone na 3 grupy: A – grupa otrzymała domaciczną inokulację zawiesiny bakterii *E. coli* (n = 4), B – grupa otrzymała domaciczny wlew płynu fizjologicznego (n = 3) i C – która stanowiła grupę kontrolną (n = 4). Zwierzęta wszystkich grup utrzymywane były w oddzielnych kojcach o powierzchni 5 m^2. Dostęp naturalnego światła w ciągu dnia wynosił 14,5 ± 1,5 h. Temperaturę w zwierzętarni utrzymywano na poziomie 18 ± 2°C. W celu eliminacji stresu wywołanego transportem oraz lepszej adaptacji świń do nowych pomieszczeń, do czasu rozpoczęcia procedur związanych z częścią doświadczalną eksperymentu zwierzęta odpoczywały przez okres 3 dni.

Przed rozpoczęciem części eksperymentalnej loszki zostały poddane badaniu klinicznemu w celu wykluczenia zaburzeń w procesach rozrodczych. Podczas całego okresu trwania doświadczenia zwierzęta miały stały dostęp do wody oraz pełnoporcjowej mieszanki paszowej odpowiedniej do ich wieku oraz gatunku.

6.2 Procedury operacyjne

6.2.1 Premedykacja i znieczulenie ogólne

W dniu 0 doświadczenia (dzień 17 cyklu rujowego) przeprowadzono zabiegi operacyjne. Wszystkie loszki w celu premedykacji otrzymały siarczan atropiny (0,05 mg/kg mc) w postaci iniekcji domięśniowej (*Atropinum sulf.* WZF, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A., Polska), azaperon (2 mg/kg mc) w iniekcji domięśniowej (Stresnil, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgia) oraz chlorowodorek ketaminy (10 mg/kg mc) w iniekcji dożylnej do żyły brzeżnej ucha (Ketamina, Biowet, Puławy, Polska). Wykonana premedykacja miała na celu neurolepsję, miorelaksację oraz analgezję

przygotowując zwierzęta do wprowadzenia ich w stan głębokiego znieczulenia ogólnego, charakteryzującego się całkowitym zniesieniem czucia bólu. Znieczulenie ogólne wywołano chlorowodorkiem ketaminy (10 mg/kg mc, w iniekcji dożylnej (Ketamina, Biowet, Puławy, Polska), a podtrzymywano obliczonymi dawkami tego samego środka znieczulającego (1 mg/kg mc, podawane co pięć minut, w iniekcji dożylnej).

6.2.2 Techniki operacyjne

Po unieruchomieniu zwierząt i wygoleniu sierści pole operacyjne odkażano alkoholowym roztworem jodyny (*Solutio iodi spirituosa*, Biowed – Drwalew, PL) oraz nakryto jałową, jednorazową serwetą operacyjną. W trakcie przeprowadzania laparotomii pośrodkowej wykonano przecięcie skóry, powięzi powierzchownej, pochwy mięśnia prostego brzucha w linii białej oraz otrzewnej. Po odsunięciu pęcherza moczowego oraz pętli jelita czczego zlokalizowano lewy i prawy róg macicy. Następnie dokonano iniekcji 5% wodnego roztworu neuronalnego znacznika fluorescencyjnego Fast Blue (FB) (EMS-CHEMIE, GmbH, Niemcy) w ścianę obu rogów macicy. Iniekcji dokonano przy użyciu strzykawki typu Hamilton zaopatrzonej w igłę o rozmiarze 26. Znacznik podany został w trzy obszary rogów macicy – przyszyjkowy, środkowy i przyjajnikowy. W każdym z nich wykonano 13 osobnych iniekcji FB w obszar o średnicy pierścienia iniekcyjnego wynoszący 2 cm. Objętość pojedynczej iniekcji wynosiła 2 µl, a całkowita ilość znacznika podana w nastrzykiwany obszar wynosiła − 26 µl. Ze względu na możliwość niekontrolowanego wycieku FB igłę pozostawiano nieruchomo przez 60 sekund w miejscu każdej aplikacji. Miejsca wstrzyknięć dodatkowo spłukano izotoniczną solą fizjologiczną i przetarto gazą. Po wykonaniu procesu podawania znacznika neuronalnego oraz przywróceniu anatomicznego ułożenia narządów wewnętrznych jamy brzusznej i miednicznej dokonano szycia powłok ciała. Wykonano to zakładając 3 piętra szwów chirurgicznych: 1 piętro – założono na otrzewną trzewną; 2 piętro – na mięśnie i powięzi (w obydwu przypadkach użyto szwu ciągłego); 3 piętro – skórę wraz z tkanką podskórną zszyto szwem materacowym przerywanym. Ranę pooperacyjną zdezynfekowano roztworem jodyny oraz zabezpieczono przed zanieczyszczeniem zmikronizowanym glinem (Alu – derm, Moreau-ArdePharm, FR). Po 28 dniach (optymalny czas wstecznego transportu znacznika neuronalnego FB i jego gromadzenia się w ciałach komórek nerwowych zwoju przyszyjkowego), w 3 dniu cyklu rujowego, przeprowadzono kolejne zabiegi eksperymentalne odpowiednie dla poszczególnych grup doświadczalnych:

Grupa A – grupa zwierząt otrzymujących zawiesinę bakterii *E. coli*. U zwierząt z tej grupy po dokonaniu ponownej laparotomii zgodnie z techniką opisaną powyżej dokonano inokulacji zawiesiny bakteryjnej (*E. coli*; szczep - O25:K23/a/:H1; 109 jednostek tworzących kolonię/ml). Bakterie pozyskano z Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach.

Grupa B – grupa zwierząt otrzymujących roztwór soli fizjologicznej - u zwierząt z tej grupy, po dokonaniu ponownej laparotomii zgodnie z techniką opisaną powyżej, zaaplikowano 0,9% roztwór chlorku sodu do rogów macicy w 10 iniekcjach; w trakcie każdej podano 10 ml roztworu, a łączna objętość zaaplikowanej soli fizjologicznej wynosiła 50 ml.

Grupa C – grupa zwierząt kontrolnych, u których przeprowadzono jedynie laparotomię pośrodkową (tzw. operacja ślepa) oraz dokonano szycia rany pooperacyjnej zgodnie z procedurami opisanymi powyżej;

6.2.3 Pobranie materiału do badań

Osiem dni po podaniu zawiesiny bakterii oraz płynu fizjologicznego (11 dzień cyklu rujowego) zwierzętom ze wszystkich grup, po ówczesnej premedykacji opisanej powyżej, podano letalną dawkę tiopentalu sodu (Morbital, Biowet Puławy, Polska). Po zatrzymaniu akcji oddechowej oraz pracy serca dokonano otwarcia klatki piersiowej. Następnie do lewej komory serca wprowadzono kaniulę w celu dokonania perfuzji dosercowej. Zwierzęta perfundowano 4% zbuforowanym roztworem paraformaldehydu (pH=7,4). Po wypreparowaniu, macicę wraz z przynależnymi do niej więzadłami dotrwalano w mieszaninie utrwalającej przez okres 10 min. Do dalszych badań z macicy wycinano szyjkę macicy wraz ze zwojem przyszyjkowym. W dalszej kolejności pobrany materiał dwukrotnie płukano w buforze fosforanowym (0,1 M, pH = 7,4). Zmiany buforu dokonywano co 24 h. Po kolejnych 24 godzinach tkanki przełożono do 18% zbuforowanego roztworu sacharozy (0,1 M. pH=7,4) z dodatkiem 0,001% roztworu azydku sodu. W roztworze sacharozy szyjki macicy były przechowywane w temperaturze 4^{o}C przez okres 14 dni. Po tym czasie sporządzono bloczki mrożeniowe, które przechowywane były w temperaturze -80^{o}C do czasu przeprowadzenia dalszych badań.

W celu określenia formy zapalenia, fragmenty rogów macicy były utrwalane w 4% roztworze paraformaldehydu (pH 7,4) przez 24 godziny, po czym tkanki te zostały wypłukane w 0,1M roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, pH 7,4) i zatopione w parafinie.

6.3 Techniki barwień immunofluorescencyjnych i immunohistochemicznych

6.3.1 Barwienia immunofluorescencyjne

Bloczki mrożeniowe były krojone w temperaturze -25ºC w kriostacie (Frigocut, Reichert-Jung, Nussloch, Niemcy) na skrawki seryjne o grubości 14µm. Skrawki zbierano na szkiełka podstawowe pokryte roztworem ałunu chromowego i żelatyną. Do czasu przeprowadzenia procedury barwień szkiełka były przechowywane w temperaturze -25ºC. Do dalszych badań wybierano te preparaty, które zawierały komórki FB-pozytywne. W pierwszej kolejności skrawki osuszano w temperaturze pokojowej przez okres 45 minut. Następnie były one 3-krotnie płukane (3x15 minut) w 0,1 M soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS; pH 7,4). W celu wyeliminowania nieswoistego świecenia tła skrawki inkubowano przez 60 min. W temperaturze pokojowej w buforze blokującym zawierającym 10% surowicę kozią w 0,1M PBS, 0,1% surowicę oślą, 1% Triton X-100, 0,05% timerosal i 0,01% NaN_3. Następnie skrawki ponownie płukano, po czym przed nałożeniem przeciwciał pierwotnych, w celu uniknięcia ich zmieszania, każdy skrawek obrysowano PAP-penem (DAKO, Glostrup, DK). W dalszej kolejności skrawki inkubowano w temperaturze pokojowej przez noc w mieszaninie różnogatunkowych przeciwciał pierwotnych. Wykaz przeciwciał oraz użyte stężenia znajdują się w Tabeli 1. Wszystkie przeciwciała zostały rozcieńczone w roztworze PBS zawierającym 0,3% Triton X-100 oraz 1% albuminę surowicy bydlęcej (BSA). Następnego dnia skrawki płukano trzykrotnie w roztworze PBS przez 15 minut, po czym inkubowano z przeciwciałami wtórnymi (lista przeciwciał wtórnych wykorzystanych w niniejszym doświadczeniu znajduje się w Tabeli 1). Następnie skrawki ponownie 3-krotnie płukano w roztworze PBS. W ostatnim etapie skrawki przykrywano szkiełkiem nakrywkowym z wykorzystaniem zbuforowanego roztworu glicerolu.

6.3.2 Barwienia immunohistochemiczne

Do wykazania aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) lub jej braku w neuronach cholinergicznych unerwiających macicę zastosowano zmodyfikowaną metodę Karnovsky'ego-Rootsa. Przed właściwym barwieniem skrawki zawierające neurony immunoreaktywne dla VAChT sfotografowano cyfrową kamerą monochromatyczną (Zeiss AxioImager) podłączoną do komputera, a współrzędne każdego zdjęcia zapisano w celu zlokalizowania tego samego neuronu po barwieniu za pomocą wyżej wymienionej metody.

Po wybraniu właściwych skrawków inkubowano je w przezroczystym, zielonym, stabilnym podłożu zawierającym 5 mg jodku acetylocholiny rozpuszczonym w 6,5 ml 0,1M buforu wodoromaleinianu sodu o pH 6,0, 0,5ml 0,1M cytrynianu sodu, 1ml 30mM $CuSO_4$, 1ml wody i 1ml 5mM żelazicyjanku potasu. Inne cholinesterazy hamowane były przez 0,05 mM tetraizopropylopirofosforamid (iso-OMPA, Sigma, Darmstadt, Niemcy). Czas inkubacji wynosił 2 godziny w 37°C. Skrawki następnie płukano w wodzie destylowanej z delikatnym mieszaniem przez 10 minut za pomocą kołyski laboratoryjnej.

Po wybarwieniu neurony VAChT-immunoreaktywne były dalej sprawdzane pod mikroskopem w celu zliczenia komórek AChE-dodatnich, po czym zostały sfotografowane. Ciała komórkowe AChE-dodatnie zliczono dla około 50 VAChT-dodatnich neuronów zaopatrujących macicę przez PCG u każdej świni.

6.3.3 Testy specyficzności

W niniejszej pracy przeprowadzono następujące testy specyficzności:

Test preabsorbcji: 1 ml badanych przeciwciał pierwotnych w odpowiednim rozcieńczeniu roboczym zmieszano ze specyficznym dla nich antygenem. Zawartość inkubowano przez okres 24 godzin w lodówce. Po inkubacji z tak sporządzoną mieszaniną, po uprzednim naniesieniu przeciwciał wtórnych, nie obserwowano reakcji antygen–przeciwciało.

Test z ominięciem przeciwciała pierwotnego: w teście tym pomijano etap inkubacji skrawka z mieszaniną przeciwciał pierwotnych. Pozostałe procedury barwienia zostały zachowane. W przebiegu tego testu wyeliminowano nieswoiste łączenie się znakowanych surowic wtórnych ze strukturami białkowymi obecnymi na terenie zwoju przyszyjkowego.

Test z zastąpieniem przeciwciała pierwotnego: w teście tym zamiast specyficznego przeciwciała pierwotnego użyto surowicę pozyskaną od tego samego gatunku zwierzęcia co przeciwciało pierwotne (jednak zwierzę nie było wcześniej immunizowane). W teście tym wyeliminowano nieswoiste łączenie się immunoglobulin klasy G, które są obecne w surowicy danego gatunku w warunkach fizjologicznych, z białkami występującymi w badanym materiale.

6.4 Analiza mikroskopowa obrazów

Wybarwione preparaty analizowano z wykorzystaniem mikroskopów Olympus BX51 (Olympus, Polska) oraz Zeiss AxioImager (Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Obydwa

mikroskopy umożliwiają obserwację preparatów poddanych barwieniom fluorescencyjnym w świetle odbitym. Obydwa mikroskopy wyposażone są w zestaw wąskopasmowych filtrów, dzięki którym możliwa jest obserwacja wstecznie wyznakowanych ciał komórek nerwowych, jak również wzbudzenie sygnału w neuronach wybarwionych odpowiednio znakowanymi fluorochromami sprzężonymi z przeciwciałami wtórnymi. Fotografie wykonano za pomocą kamery cyfrowej sprzężonej z komputerem i obsługiwanej za pomocą odpowiedniego programu komputerowego (Zeiss AxioImager.M20s Axiocam 705, Olympus XM 10).

6.5 Analiza statystyczna

W niniejszej pracy wykonano podwójne barwienia immunofluorescencyjne w następującej kombinacji antygenów:

DβH/SOM, DβH/VIP, DβH/NPY i DβH/nNOS, jak również VAChT/VIP, VAChT/SOM, VAChT/GAL i VAChT/nNOS.

Dane uzyskane z PCG u loszek z grupy kontrolnej (n = 4), płyn fizjologiczny (n = 3) oraz bakteryjnej (n = 4) zostały uśrednione w stosunku do całkowitej liczby neuronów zwojowych, populacji komórek nerwowych w lewo- i prawostronnym PCG oraz neuronów z określonym kodowaniem chemicznym dla każdej grupy. Dane wyrażono jako wartości procentowe całkowitej populacji komórek nerwowych macicy wybarwionych w kierunku dwóch substancji w każdej grupie, przyjęte jako 100%. W przypadku barwienia w kierunku aktywności AChE dane wyrażono jako liczbę dodatnio wybarwionych neuronów. Do obliczenia błędu standardowego średniej (± SEM) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test Bonferroniego. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, Stany Zjednoczone). Różnice uznano za istotne przy $p < 0,05$.

Ryc. 1. Uproszczony schemat przedstawiający procedurę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych.

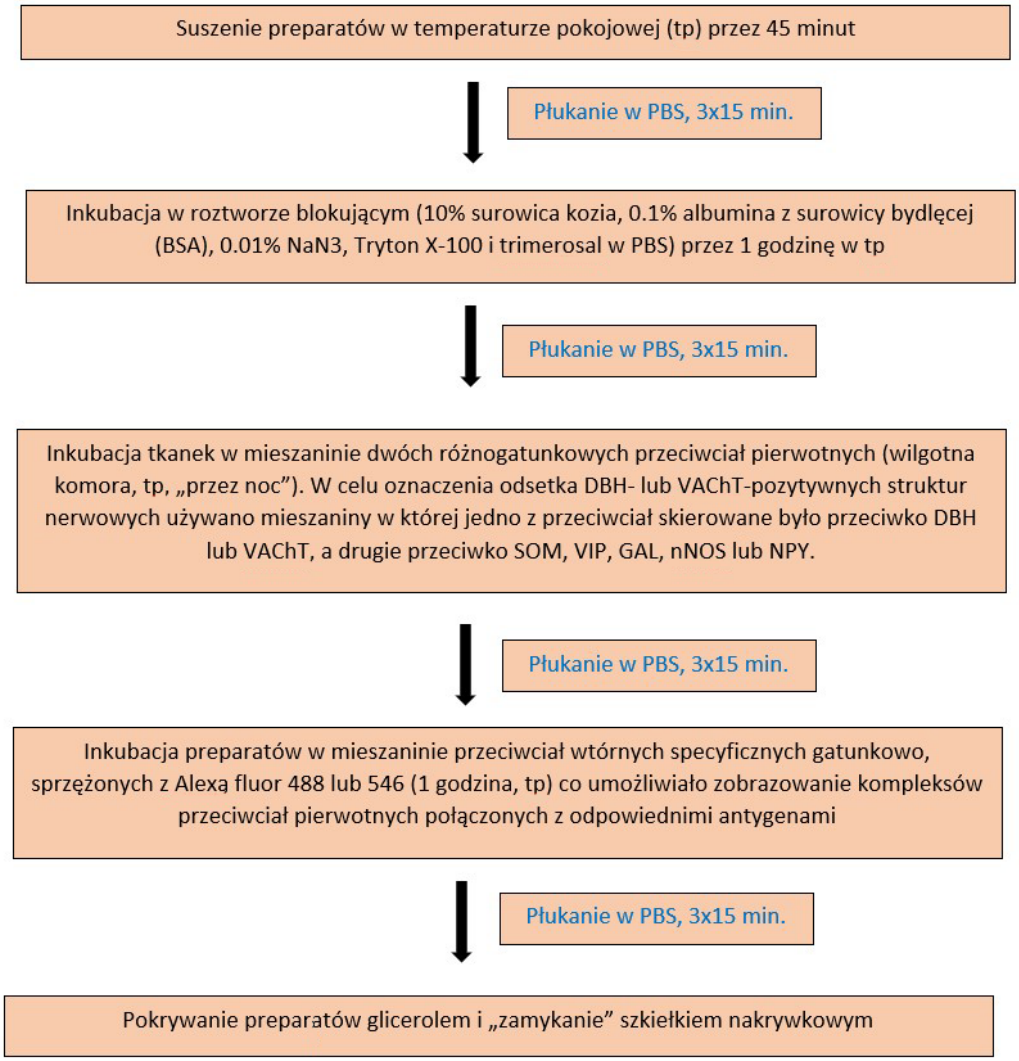


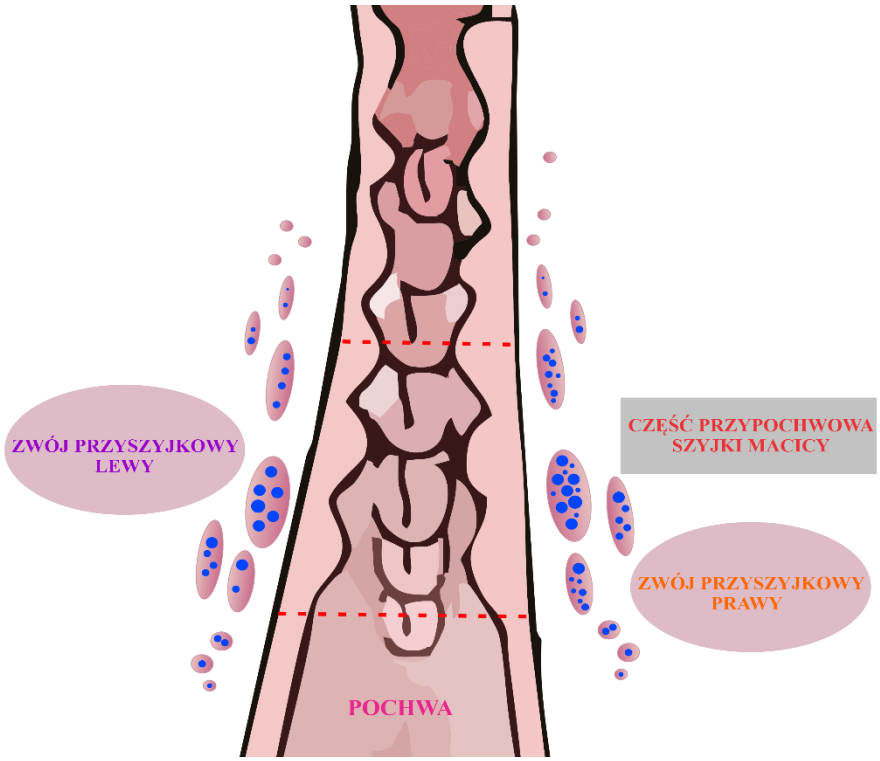
Tabela 1. Lista przeciwciał pierwotnych i wtórnych użytych w niniejszym badaniu.

Przeciwciała pierwotne				
Antygen	**Kod**	**Gatunek**	**Rozcieńczenie**	**Pochodzenie**
DβH	AB1585	Królik	**1:500**	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
VIP	ABS 023-02	Mysz	**1:1000**	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
SOM	8330-0009	Szczur	**1:60**	Bio-Rad Laboratories, Watford, United Kingdom
NPY	ABS 028-08-02	Mysz	**1:1000**	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
nNOS	N218	Mysz	**1:1000**	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
GAL	T-5036	Kawia domowa	**1:1000**	Peninsula Labs, San Carlos, CA, USA
VAChT	V5387	Królik	**1:2000**	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Przeciwciała wtórne				
Fluorochromy			**Rozcieńczenie**	**Pochodzenie**
Kozia anty-królicza IgG sprzężona z Alexa fluor 546			**1:1000**	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ośla anty-mysia IgG sprzężona z Alexa fluor 488			**1:1000**	ThermoFisher Scientific
Kozia skierowana przeciwko kawii domowej IgG sprzężona z Alexa fluor 488			**1:1000**	ThermoFisher Scientific
Ośla anty-szczurza IgG sprzężona z Alexa fluor 488			**1:1000**	ThermoFisher Scientific

7. Wyniki

7.1 Określenie liczby i dystrybucji wstecznie wyznakowanych neuronów zaopatrujących macicę na terenie zwoju PCG

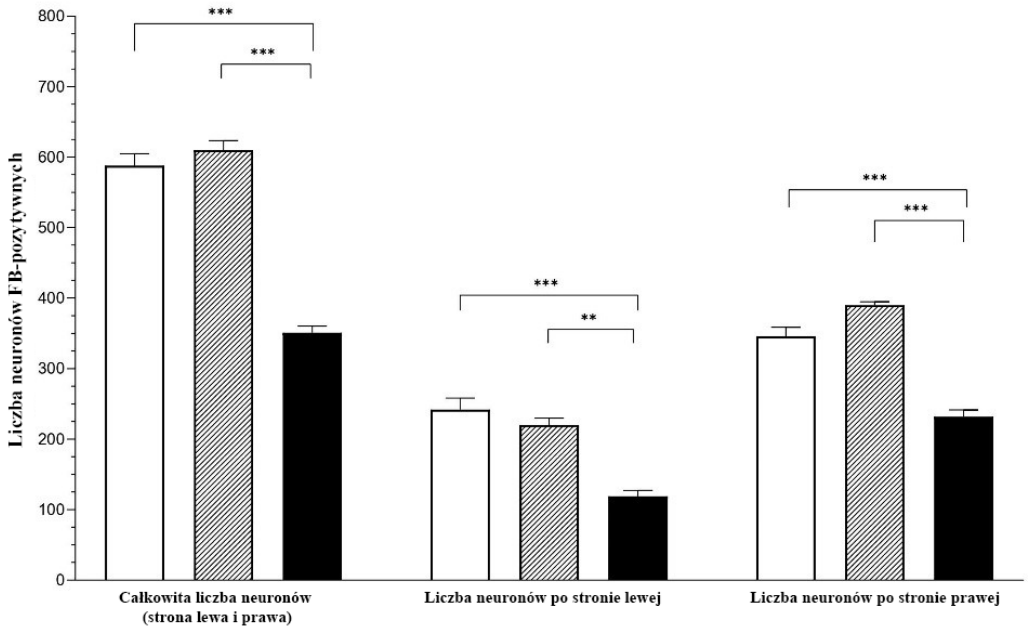
Wstecznie wyznakowane neurony FB-pozytywne występowały zarówno w prawym, jak i w lewym zwoju PCG. Topograficznie neurony te w przeważającej większości zlokalizowane były w zwojach położonych w okolicy pierwszych 5 centymetrów części przypochwowej szyjki macicy. Co więcej, ilość tych neuronów, jak również ich rozmieszczenie i liczebność poszczególnych zgrupowań wchodzących w skład PCG, ulegała wyraźnemu zmniejszeniu w kierunku dogłowowym. Dodatkowo większa ilość neuronów znajdowała się w zwoju prawym.



Ryc 2. Lokalizacja prawego i lewego zwoju przyszyjkowego oraz różnice w dystrybucji neuronów FB-dodatnich (niebieskie punkty) zaopatrujących macicę świni po obu stronach.

W grupie zwierząt kontrolnych całkowita ilość wstecznie wyznakowanych neuronów wynosiła 588 ± 16,7, z czego w prawym zwoju ich liczba wynosiła 346 ± 12,7, natomiast w lewym odpowiednio 242 ± 16,3. W grupie zwierząt, którym podano płyn fizjologiczny odnotowano zwiększenie całkowitej liczby komórek nerwowych zawierających FB (610 ± 13,24). Również w prawym zwoju liczba ta zwiększyła się odpowiednio do wartości 390 ±

4,91, natomiast w lewym PCG odnotowano spadek liczby neuronów (220 ± 9,9). Jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Wywołanie stanu zapalnego spowodowało statystycznie istotny spadek ilości neuronów FB-dodatnich zarówno w prawym jak i w lewym zwoju, co jednocześnie wpłynęło na zmniejszenie się całkowitej liczby neuronów FB-pozytywnych (351 ± 9,20). Pod względem ilościowym zmniejszenie liczby neuronów w prawym zwoju (232 ± 9,35) było mniejsze w porównaniu ze zwojem lewym (119 ± 8,34).



Ryc. 3. Całkowita, lewostronna i prawostronna liczba komórek FB-pozytywnych (średnia ± SEM) w zwoju przyszyjkowym (PCG) unerwiających macicę loszek w grupie kontrolnej (białe słupki), grupie z płynem fizjologicznym (szare słupki) i w grupie z inokulacją *E. coli* (czarne słupki) (** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ pokazują różnice między wszystkimi grupami w tym samym regionie zwoju).

7.2 Określenie liczby neuronów zwoju PCG unerwiających macicę świni, immunoreaktywnych wobec DβH, SOM, VIP, NPY i nNOS

Podanie domaciczne zawiesiny bakterii i wywołanie w ten sposób stanu zapalnego spowodowało istotne zmiany we wstecznie wyznakowanych neuronach współczulnych. Analizie statystycznej poddana została następująca kombinacja substancji biologicznie czynnych:

DβH/SOM, DβH/VIP, DβH/NPY i DβH/nNOS

W porównaniu z grupą kontrolną i grupą otrzymującą płyn fizjologiczny liczba wstecznie wyznakowanych perykarionów macicznych wykazujących ekspresję zarówno DβH jak i VIP (DβH+/VIP+) wzrosła statystycznie istotnie w zwoju PCG u loch z wywołanym stanem zapalnym macicy ($p < 0,001$). Natomiast liczebność populacji neuronów wykazujących jedynie ekspresję VIP (DβH-/VIP+) uległa zwiększeniu ($p < 0,01$) w stosunku do grupy zwierząt otrzymujących płyn fizjologiczny. Ponadto, liczba neuronów wykazująca ekspresję jedynie β-hydroksylazy dopaminy (DβH+/VIP-) w grupie, w której dokonano iniekcji *E. coli* uległa zmniejszeniu ($p < 0,05$) w porównaniu zarówno do grupy kontrolnej, jak i grupy otrzymującej płyn fizjologiczny. Liczebność populacji neuronów o fenotypie (DβH-/VIP-) u zwierząt, którym podano zawiesinę *E. coli* również zmniejszyła się w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$) i z płynem fizjologicznym ($p < 0,001$).

W zwoju PCG loszek, u których dokonano inokulacji *E. coli*, liczba neuronów o fenotypie DβH+/SOM+ uległa istotnemu wzrostowi w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej ($p < 0,01$) i grupy zwierząt, którym podano płyn fizjologiczny ($p < 0,05$). Ponadto w grupie bakteryjnej w porównaniu z dwiema grupami kontrolnymi odnotowano wzrost ilości neuronów ($p < 0,01$) wykazujących ekspresję samej somatostatyny (DβH-/SOM+). Natomiast spadek ilości neuronów unerwiających macicę widoczny był w populacji neuronów nie wykazujących ekspresji DβH ani somatostatyny (DβH-/SOM-), co zostało odnotowane w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) jak i grupy otrzymującej sól fizjologiczną ($p < 0,01$).

W przypadku wykonania podwójnego barwienia z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko DβH i NPY zaobserwowano wzrost populacji neuronów o fenotypie DβH+/NPY+ w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami (grupa kontrolna: $p < 0,05$, grupa z solą fizjologiczną: $p < 0,01$). Odwrotną sytuację odnotowano w przypadku neuronów wykazujących jedynie ekspresję dla DβH (DβH+/NPY-), gdzie nastąpiło istotne zmniejszenie ($p < 0,05$) ilości neuronów w stosunku do grupy z solą fizjologiczną.

Ostatnią substancją badaną w neuronach adrenergicznych był nNOS. Stan zapalny macicy doprowadził do wzrostu liczby neuronów o fenotypie DβH+/nNOS+ w porównaniu z dwiema innymi badanymi grupami ($p < 0,001$) oraz do zmniejszenia populacji neuronów DβH+/nNOS- (grupa kontrolna: $p < 0,05$, grupa z płynem fizjologicznym: $p < 0,01$). Podobnie spadek ilości neuronów w stosunku do grupy kontrolnej odnotowano w grupie neuronów o fenotypie DβH-/nNOS- ($p < 0,01$).

Dokładne wartości liczbowe i procentowe w populacjach poszczególnych grup neuronów adrenergicznych zostały przedstawione w tabelach 2 – 5 oraz na rycinach 3 – 6.

Tabela 2. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję DβH i VIP (średnia liczba neuronów ± SEM)

Kombinacja antygenów	**Grupa kontrolna**	**Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny**	**Grupa bakteryjna**
DβH+/VIP+	11,00 ± 0,41	9,33 ± 0,67	27,00 ± 0,71
DβH+/VIP-	59,00 ± 0,82	57,67 ± 3,38	50,00 ± 0,82
DβH-/VIP+	38,50 ± 1,04	35,33 ± 0,88	43,25 ± 1,49
DβH-/VIP-	93,50 ± 1,32	97,33 ± 2,60	80,50 ± 1,89

Tabela 3. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję DβH i SOM (średnia liczba neuronów ± SEM)

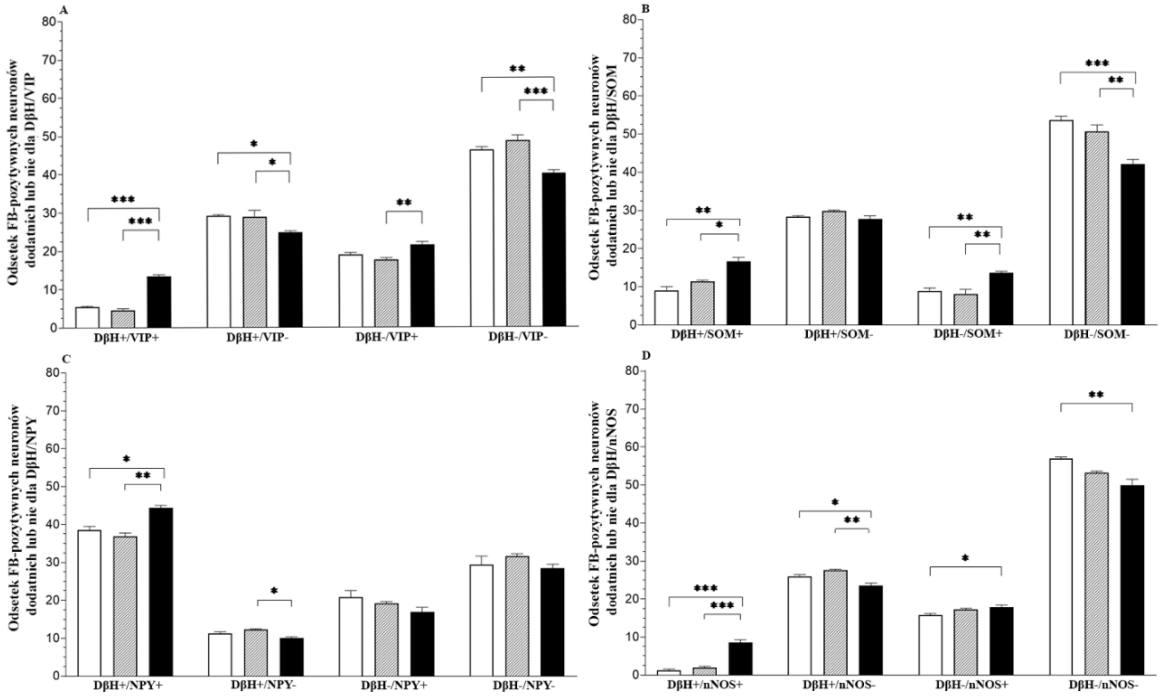
Kombinacja antygenów	**Grupa kontrolna**	**Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny**	**Grupa bakteryjna**
DβH+/SOM+	18,25 ± 1,97	23,00 ± 0,58	33,00 ± 2,04
DβH+/SOM-	57,25 ± 0,75	60,00 ± 0,58	56,00 ± 1,68
DβH-/SOM+	18,00 ± 1,64	16,33 ± 2,40	27,50 ± 0,87
DβH-/SOM-	108,25 ± 2,25	102,00 ± 3,61	85,00 ± 2,20

Tabela 4. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję DβH i NPY (średnia liczba neuronów ± SEM)

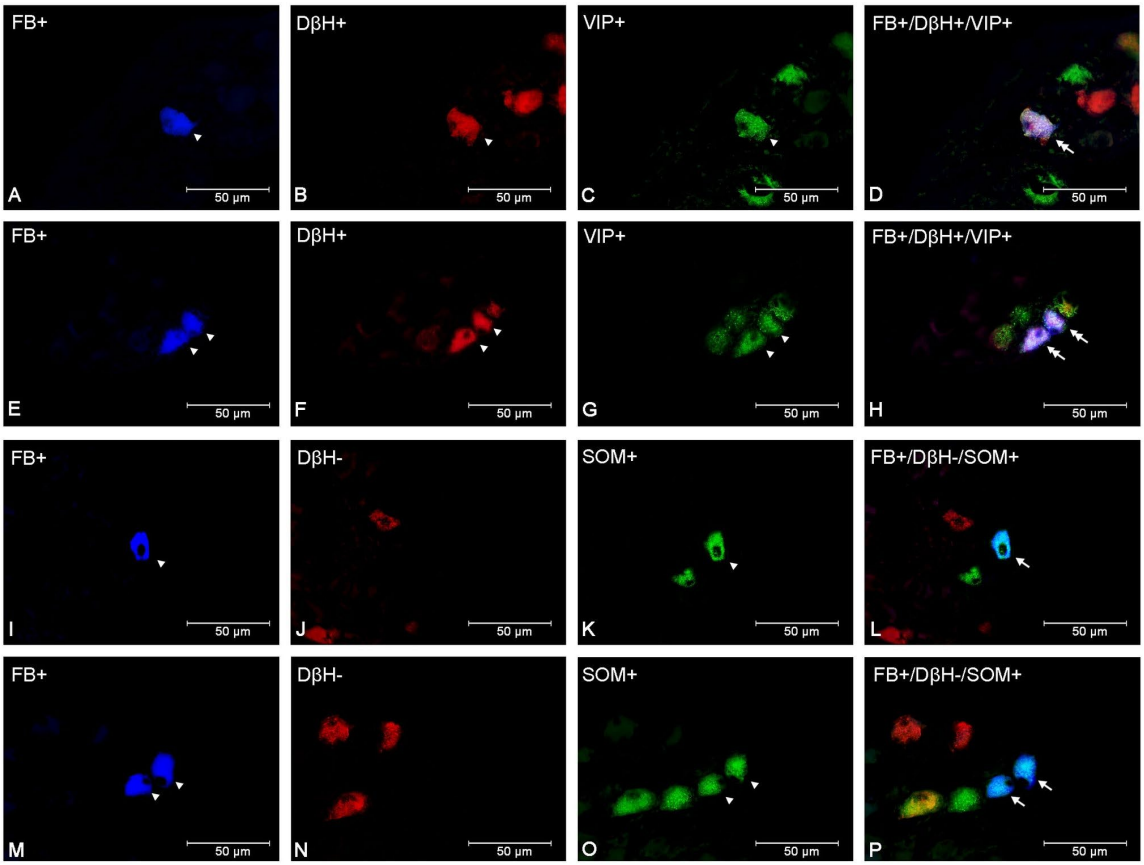
Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
DβH+/NPY+	77,50 ± 1,55	74,33 ± 1,20	90,00 ± 0,82
DβH+/NPY-	22,50± 0,96	24,67 ± 0,33	20,50 ± 0,65
DβH-/NPY+	41,75 ± 3,47	38,67 ± 1,20	34,25 ± 2,50
DβH-/NPY-	59,00 ± 4,71	63,67 ± 1,76	57,75 ± 2,29

Tabela 5. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję DβH i nNOS (średnia liczba neuronów ± SEM)

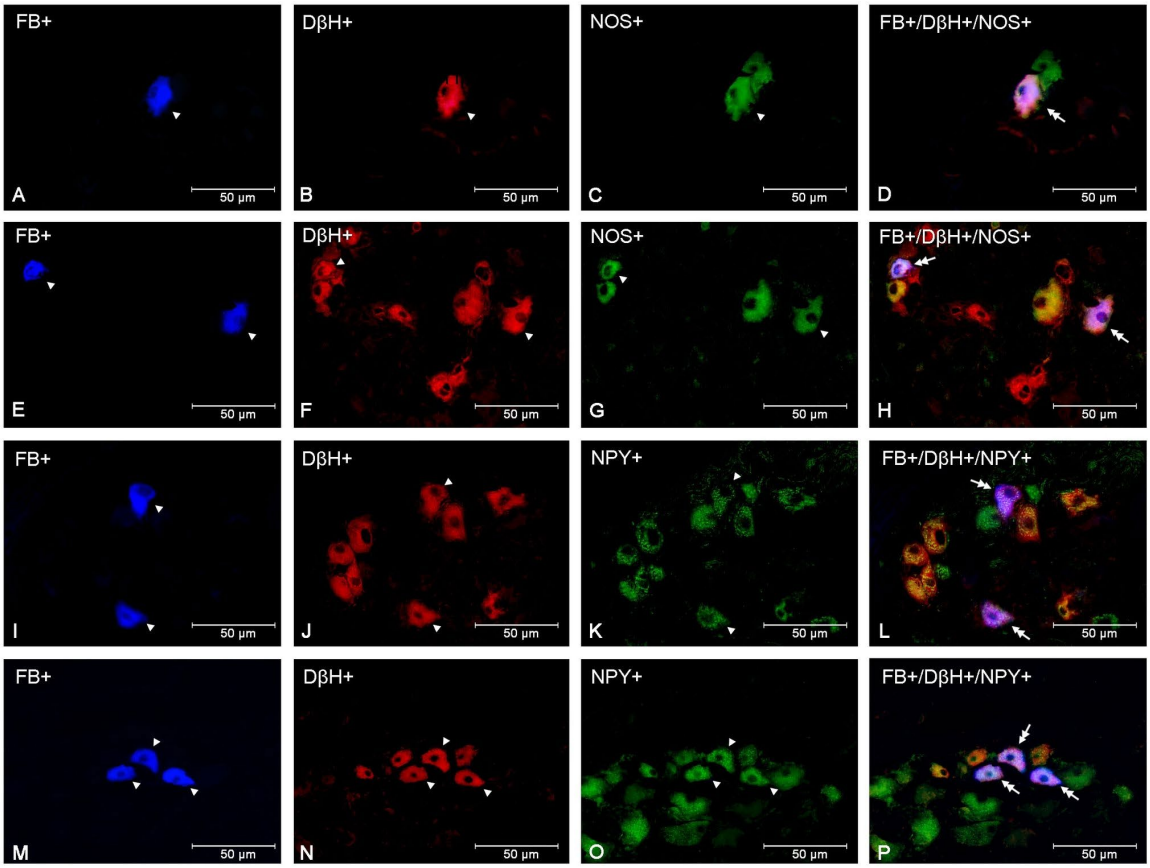
Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
DβH+/nNOS+	2,50 ± 0,65	4,00 ± 0,58	17,25 ± 1,44
DβH+/nNOS-	52,00 ± 0,71	55,00 ± 0,58	47,25 ± 1,38
DβH-/nNOS+	31,50 ± 0,96	34,33 ± 0,88	36,00 ± 1,08
DβH-/nNOS-	114,00 ± 0,71	106,00 ± 0,58	100,50 ± 2,90



Ryc. 4. Wykresy przedstawiające populacje (wyrażone w procentach, średnia ± SEM) neuronów wykazujących ekspresję β-hydroksylazy dopaminy (DβH) i/lub wazoaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP) (A), DβH i/lub somatostatyny (SOM) (B), DβH i/lub galaniny (GAL) (C) i DβH i/lub neuronalnej izoformy syntazy tlenku azotu (nNOS) (D), jak również populacje neuronów nie wykazujących ekspresji tych substancji w zwoju PCG loszek z grupy kontrolnej (białe słupki), soli fizjologicznej (skośnie kreskowane słupki) i *E. coli* (czarne słupki). Dane są wyrażone jako wartości procentowe całkowitej populacji neuronów macicznych wybarwionych pod kątem dwóch substancji, w każdej grupie traktowane jako 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$, pokazują różnice między wszystkimi grupami dla tej samej populacji neuronów macicy.



Ryc. 5. Mikrofotografie przedstawiające wstecznie wyznakowane neurony immunoreaktywne wobec DβH (B, F, J, N), VIP (C, G) i SOM (K, O) w zwoju PCG loszek z grupy kontrolnej (A-D), otrzymującej bakterie z grupy *E. coli* (E-H, M-P) i sól fizjologiczną (I-L). Grot strzałki wskazuje neuron Fast Blue (FB)-dodatni, immunoreaktywny dla DβH i VIP oraz perykariony immunoreaktywne wobec SOM. Podwójna strzałka wskazuje FB-dodatni neuron maciczny wykazujący ekspresję DβH i VIP. Strzałka wskazuje perykarion FB-dodatni z jednoczesną ekspresją SOM. Fotografie (D, H, L, P) zostały wykonane przez cyfrowe nałożenie obrazu uzyskanego z 3 kanałów: FB-dodatni (niebieski), DβH-dodatni (czerwony) i SOM- lub VIP-dodatni (zielony). Jeden neuron maciczny immunoreaktywny wobec DβH i VIP jest widoczny u loszek z grupy kontrolnej (A-D). W PCG grupy *E. coli* widoczna jest zwiększona liczba neuronów zawierających badane substancje (E-H). Jeden perykarion wykazuje obecność SOM, ale nie DβH będąc obecny w zwoju pochodzącym z grupy zwierząt otrzymujących płyn fizjologiczny (I-L).



Ryc. 6. Mikrofotografie przedstawiające neurony DβH (B, F, J, N), nNOS (C, G) i NPY (K, O) pozytywne występujące we wstecznie wyznakowanych neuronach zwoju PCG loszek z grupy kontrolnej (A-D), otrzymującej bakterie z grupy *E. coli* (E-H, M-P) i sól fizjologiczną (I-L). Grot strzałki wskazuje neuron Fast Blue (FB)-dodatni, oraz neurony immunoreaktywne wobec DβH i nNOS/NPY, neuron immunoreaktywny wobec NPY, jak również względem nNOS. Podwójna strzałka wskazuje FB-dodatni neuron maciczny immunoreaktywny wobec DβH i nNOS/NPY. Fotografie uzyskano przez cyfrowe nałożenie trzech kanałów: FB dodatni (niebieski), DβH-dodatni (czerwony) i nNOS- lub NPY-dodatni (zielony). Jeden perykarion z ekspresją nNOS i DβH jest obecny w zwoju grupy kontrolnej (A-D). W grupie *E. coli* (E-H) obserwujemy dwa perykariony wykazujące ekspresję DβH i NOS. W grupie loszek otrzymującej sól fizjologiczną (I-L) widoczne są dwa immunoreaktywne neurony wobec DβH i NPY.

7.3 Określenie liczby neuronów na terenie zwoju PCG unerwiających macicę świni immunoreaktywnych wobec VAChT, SOM, VIP, GAL i nNOS

Podanie domaciczne zawiesiny bakterii i wywołanie w ten sposób stanu zapalnego spowodowało istotne zmiany we wstecznie wyznakowanych neuronach przywspółczulnych. Analizie statystycznej poddana została następująca kombinacja substancji biologicznie czynnych:

VAChT/VIP, VAChT/SOM, VAChT/GAL i VAChT/nNOS

Przywspółczulna populacja neuronów wykazująca kolokalizację z VIP uległa wzrostowi w grupie bakteryjnej w porównaniu zarówno z grupą kontrolną, jak i z grupą z płynem fizjologicznym, w populacji neuronów o fenotypie VAChT+/VIP+ i VAChT+/VIP− ($p < 0,001$), jak również w populacji neuronów VAChT-/VIP+ w grupie kontrolnej ($p < 0,001$) i grupie z solą fizjologiczną ($p < 0,05$). Natomiast liczebność populacji neuronów VAChT-/VIP- zmniejszyła się ($p < 0,001$) w stosunku do grupy z roztworem NaCl jak i grupy kontrolnej.

Podobne zależności w neuronach zwoju PCG zaobserwowano w przypadku neuronów VAChT/SOM. W grupie doświadczalnej z bakterią *E. coli*, liczba neuronów VAChT+/SOM+ była wyższa niż w grupie kontrolnej i grupie z płynem fizjologicznym ($p < 0,01$). W grupie doświadczalnej bakteryjnej wzrost ilości neuronów odnotowano także w populacji neuronów o fenotypie VAChT+/SOM- ($p < 0,001$) w odniesieniu do obu grup oraz VAChT-/SOM+ ($p < 0,05$) w porównaniu do grupy otrzymującej płyn fizjologiczny. Natomiast w grupie bakteryjnej o fenotypie VAChT-/SOM- stwierdzono spadek ilości neuronów w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) i grupy z płynem fizjologicznym ($p < 0,01$).

Cechą charakterystyczną neuronów galaninowych był brak tych komórek w grupie kontrolnej i w grupie z płynem fizjologicznym. W grupie kontrolnej dominującą populację stanowiły neurony nie wykazujące ekspresji ani VAChT, ani GAL, a dodatkowo ilość neuronów o takim fenotypie jako jedyna uległa zmniejszeniu w grupie zwierząt bakteryjnych ($p < 0,001$). Co więcej, w grupie bakteryjnej zaobserwowano *de novo* neurony zawierające galaninę - VAChT+/GAL+ ($p < 0,01$) i VAChT-/GAL+ ($p < 0,001$) oraz wzrost ilości neuronów o fenotypie VAChT+/GAL− ($p < 0,01$).

W przypadku neuronów nitrergicznych zapalenie macicy doprowadziło do zmniejszenia ($p < 0,001$) liczby neuronów o fenotypie VAChT+/nNOS+ oraz do wzrostu ($p < 0,001$) populacji komórek nerwowych VAChT+/nNOS− oraz VAChT-/nNOS+ w porównaniu do grupy kontrolnej i soli fizjologicznej. Dodatkowo zapalenie błony śluzowej macicy wywołało spadek ($p < 0,001$) liczby neuronów VAChT-/nNOS- w porównaniu z innymi grupami.

Dokładne wartości liczbowe i procentowe w populacjach poszczególnych grup neuronów cholinergicznych zostały przedstawione w tabelach 6 - 9 oraz rycinach 7-9.

Tabela 6. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję VAChT i VIP (średnia liczba neuronów ± SEM)

Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
VAChT+/VIP+	1,75 ± 0,75	1,67 ± 0,33	10,25 ± 0,63
VAChT+/VIP-	5,50 ± 0,65	4,33 ± 0,33	19,50 ± 0,96
VAChT-/VIP+	35,25 ± 0,95	39,33 ± 1,45	44,75 ± 1,44
VAChT-/VIP-	159,75 ± 1,03	156,00 ± 2,08	126,00 ± 1,44

Tabela 7. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję VAChT i SOM (średnia liczba neuronów ± SEM)

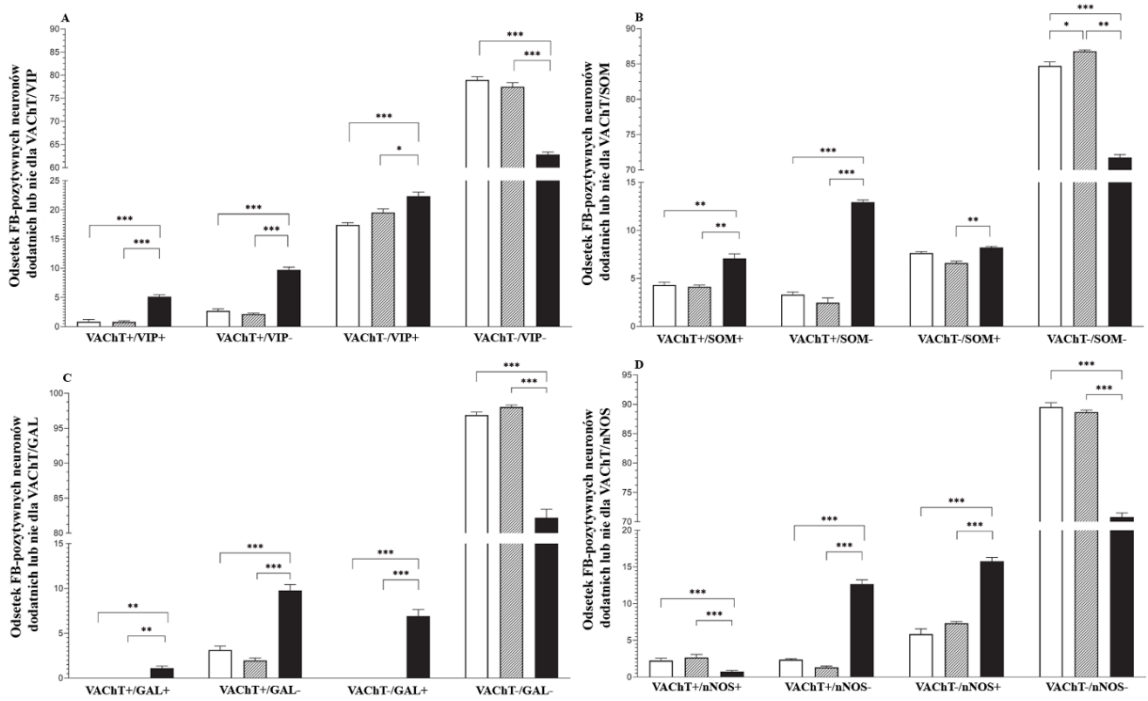
Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
VAChT+/SOM+	8,75 ± 0,63	8,33 ± 0,33	14,25 ± 1,03
VAChT+/SOM-	6,75 ± 0,63	5,00 ± 1,00	26,00 ± 0,41
VAChT-/SOM+	15,50 ± 0,29	13,33 ± 0,88	16,50 ± 0,29
VAChT-/SOM-	171,75 ± 0,85	175,33 ± 0,88	144,25 ± 0,25

Tabela 8. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję VAChT i GAL (średnia liczba neuronów ± SEM)

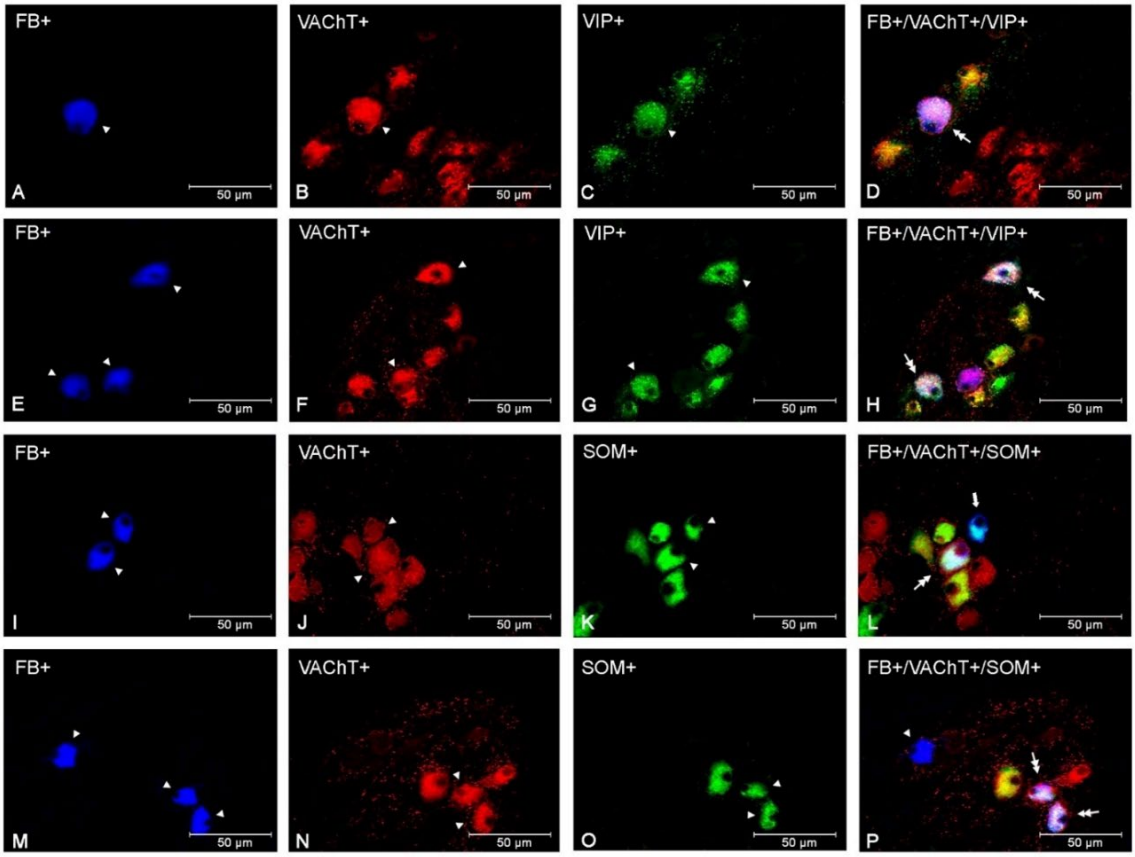
Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
VAChT+/GAL+	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	2,25 ± 0,48
VAChT+/GAL-	6,25 ± 0,85	4,00 ± 0,58	19,75 ± 1,31
VAChT-/GAL+	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	14,00 ± 1,47
VAChT-/GAL-	194,00 ± 1,58	200 ± 1,00	166,25 ± 2,56

Tabela 9. Liczebność populacji neuronów wykazujących ekspresję VAChT i nNOS (średnia liczba neuronów ± SEM)

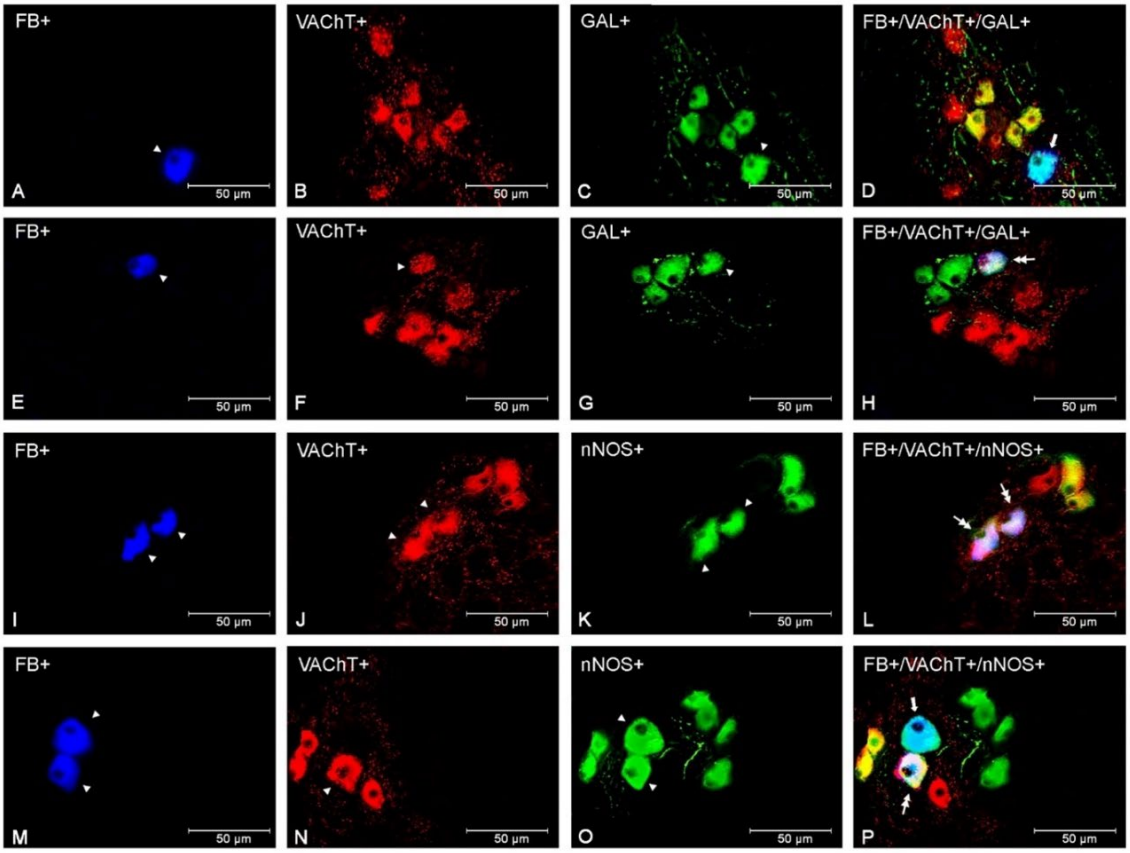
Kombinacja antygenów	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca płyn fizjologiczny	Grupa bakteryjna
VAChT+/nNOS+	4,50 ± 0,65	5,33 ± 0,88	1,50 ± 0,29
VAChT+/nNOS-	4,75 ± 0,25	2,67 ± 0,33	25,50 ± 1,19
VAChT-/nNOS+	11,75 ± 1,44	14,67 ± 0,33	31,75 ± 0,85
VAChT-/nNOS-	180,00 ± 1,58	177,33 ± 1,20	143,00 ± 2,12



Ryc. 7. Wykresy przedstawiające populacje (wyrażone w procentach, średnia ± SEM) neuronów wykazujących ekspresję pęcherzykowego transportera acetylocholiny (VAChT) i/lub wazoaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP) (A), VAChT i/lub somatostatyny (SOM) (B), VAChT i/lub galaniny (GAL) (C) i VAChT i/lub neuronalnej izoformy syntazy tlenku azotu (nNOS) (D), jak również populacje neuronów nie wykazujących ekspresji tych substancji w zwoju PCG loszek z grupy kontrolnej (białe słupki), soli fizjologicznej (skośnie kreskowane słupki) i *E. coli* (czarne słupki). Dane są wyrażone jako wartości procentowe całkowitej populacji neuronów macicy wybarwionych pod kątem dwóch substancji w każdej grupie traktowane jako 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ pokazują różnice między wszystkimi grupami dla tej samej populacji neuronów macicy.



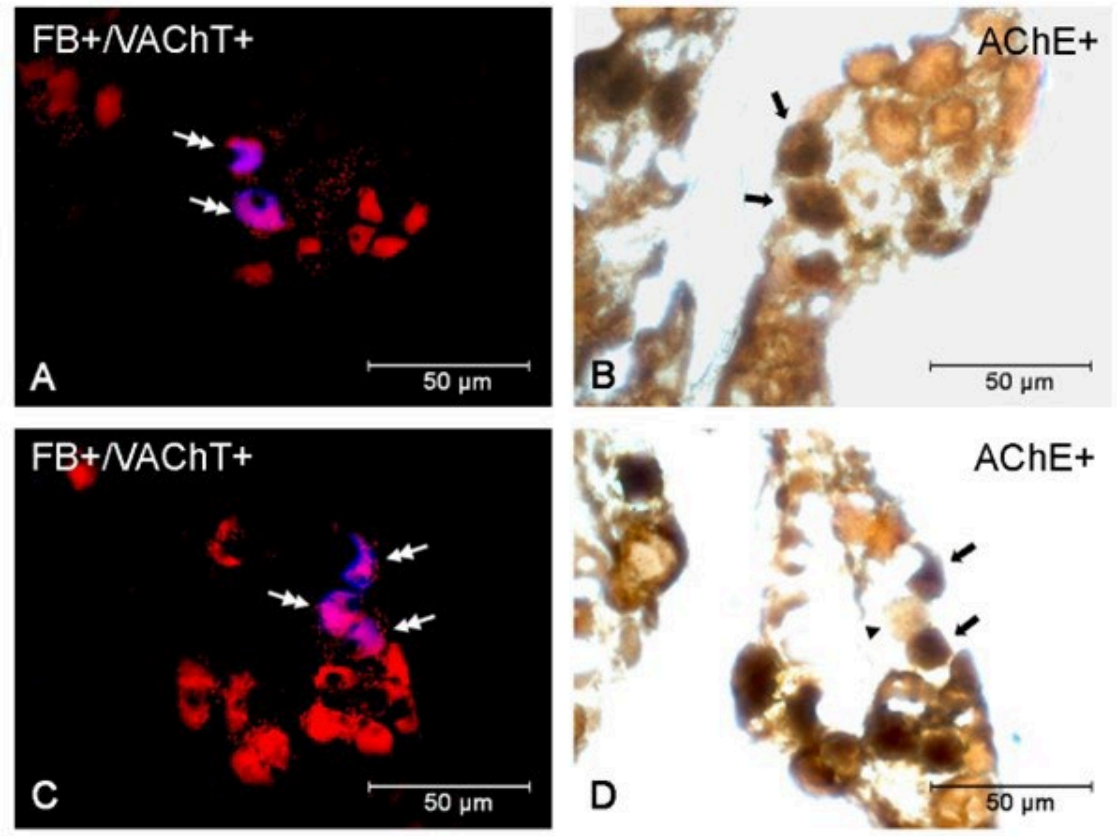
Ryc. 8. Mikrofotografie wykazujące obecność wstecznie wyznakowanych neuronów immunoreaktywnych wobec VAChT (B, F, J, N), VIP (C, G) i SOM (K, O) zwoju PCG u zwierząt z grupy kontrolnej (A–D), grupy otrzymującej bakterie *E. coli* (E–H, M–P) i zwierząt otrzymujących sól fizjologiczną (I –L). Grot strzałki wskazuje neuron Fast Blue (FB) dodatni, perykarion immunoreaktywny wobec VAChT, VIP i perykarion immunoreaktywny wobec SOM. Podwójna strzałka wskazuje FB-dodatni neuron maciczny z ekspresją VAChT i VIP oraz z VAChT i SOM. Strzałka wskazuje perykarion FB-dodatni z jednoczesną ekspresją SOM. Fotografie (D, H, L, P) zostały uzyskane przy użyciu cyfrowego nałożenia obrazu z trzech kanałów: FB-dodatni (niebieski), VAChT-dodatni (czerwony) i SOM- lub VIP-dodatni (zielony).



Ryc. 9. Mikrofotografie przedstawiające wstecznie wyznakowane neurony immunoreaktywne wobec VAChT (B, F, J, N), GAL (C, G) i nNOS (K, O) w zwoju PCG u zwierząt z grupy kontrolnej (A–D), grupy otrzymującej bakterie E. coli (E–H, M–P) i zwierząt otrzymujących sól fizjologiczną (I–L). Grot strzałki wskazuje neuron Fast Blue (FB)-dodatni, perykarion immunoreaktywny wobec VAChT, GAL, jak również perykarion immunoreaktywny wobec nNOS. Podwójna strzałka wskazuje FB-dodatni neuron maciczny z ekspresją VAChT i GAL oraz nNOS, natomiast strzałka pokazuje neuron FB-dodatni i immunoreaktywny dla GAL/nNOS. Fotografie wykonane były przy użyciu cyfrowego nałożenia obrazu uzyskanego z trzech kanałów: FB-dodatni (niebieski), VAChT-dodatni (czerwony) i nNOS- lub GAL-dodatni (zielony).

7.4 Określenie ilości neuronów zawierających AChE w zwoju PCG

W grupie zwierząt kontrolnych oraz zwierząt, którym podano sól fizjologiczną wszystkie neurony VAChT-dodatnie wykazywały silne zabarwienie AChE (a zatem ekspresję AChE), podczas gdy w grupie *E. coli*, tak intensywne wybarwienie nie było obecne. Ponadto spadek liczby wybarwionych neuronów AChE-dodatnich odnotowano w grupie eksperymentalnej, której podawano bakterie *E. coli* w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,05$) i grupy z iniekcją roztworu soli fizjologicznej ($p < 0,01$) (grupa bakteryjna 44,50 ± 1,5; grupa kontrolna: 50,50 ± 0,65; grupa z płynem fizjologicznym: 51,33 ± 0,88).



Ryc. 10. Mikrofotografie przedstawiające obecność VAChT-dodatnich (A, C) i AChE-dodatnich (B, D) ciał komórek nerwowych w zwoju PCG loszek z grup kontrolnej (A, B) i E. coli (C, D). Podwójna strzałka wskazuje neuron FB-dodatni z jednoczesną ekspresją VAChT. Strzałka wskazuje neuron FB-dodatni z ekspresją VAChT. Strzałka wskazuje AChE-dodatni neuron, podczas gdy grot strzałki wskazuje perykarion AChE-ujemny. W grupie loszek z grupy otrzymującej sól fizjologiczną widoczne są dwa neurony maciczne z ekspresją VAChT i AChE (A, B).

8. Dyskusja

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki analizy kodowania chemicznego neuronów zwoju przyszyjkowego zaopatrujących macicę świni oraz jego zmianę w reakcji na eksperymentalnie wywołany stan zapalny. Stan zapalny narządu wywołany został domaciczną iniekcją zawiesiny bakterii z grupy E. coli. Ponadto, w celu wykluczenia wpływu zabiegu operacyjnego na wynik doświadczenia na zwierzętach z grupy kontrolnej wykonano tzw. operację ślepą, natomiast u kolejnej z grup zwierząt dokonano domacicznej iniekcji roztworu płynu fizjologicznego. Wyniki tej grupy zwierząt nie różniły się statystycznie od wyników uzyskanych u zwierząt kontrolnych, co pozwala wykluczyć czynniki inwazyjne związane z inokulacją zawiesiny bakteryjnej. W celu zwiększenia prawdopodobieństwa rozwoju stanu zapalnego macicy podania bakterii dokonano w trakcie wczesnej fazy lutealnej cyklu rujowego, charakteryzującej się wzrostem syntezy progesteronu wytwarzanego w ciałku żółtym. Progesteron odznacza się silnym działaniem immunosupresyjnym sprzyjając rozwojowi stanu zapalnego. Należy podkreślić, że w tej fazie cyklu stężenie substancji o działaniu immunostymulującym, takich jak 17β-estradiol czy PGF2α, jest niskie [De Winter i in., 1996; Jana i in., 2004, 2013]. W celu potwierdzenia rozwoju stanu zapalnego przeprowadzono analizę preparatów histopatologicznych wykonanych z macic pobranych od zwierząt z grupy bakteryjnej potwierdzając wystąpienie zmian charakterystycznych dla ostrego stanu zapalnego [De Winter i in., 1995; Tummaruk i in., 2010] wyrażającego się zwiększoną liczbą neutrofili. Dodatkowo obserwowano uszkodzenie struktur nabłonka i/lub gruczołów w świetle macicy [De Winter i in., 1995].

W niniejszej pracy potwierdzono, że PCG zawiera wstecznie wyznakowane neurony, których wypustki unerwiają macicę. Rozmieszczenie tych komórek było niesymetryczne. Większa ich ilość zlokalizowana była w prawym zwoju. Jest to zgodne z wcześniej opisanymi badaniami, w których również wykazano przewagę ilościową prawego zwoju w unerwieniu macicy [Wąsowicz i in., 1998]. Jak wskazały nasze badania, stan zapalny macicy doprowadził do zmniejszenia liczby neuronów unerwiających ten narząd na terenie zwoju PCG. Pod względem topograficznym spadek ilości neuronów był zawsze bardziej znaczący w zwoju prawym. Całościowe zmniejszenie ilości neuronów unerwiających macicę jest zjawiskiem niekorzystnym, może prowadzić do zmniejszenia odporności macicy na rozwój zapalenia oraz zmniejszyć jej potencjał regeneracyjny. Zapalenie macicy wpływa negatywnie na fizjologiczne procesy zachodzące w tym narządzie jak również zaburza pracę całego układu rozrodczego. W jajniku stan ten prowadzi do upośledzenia procesu

folikulogenezy. Może też doprowadzić do tworzenia torbieli jajnikowych oraz wydłużenia fazy lutealnej [Huszenica i in., 1999; Opsomer i in., 2000; Jana i in. 2014]. Kolejną negatywną konsekwencją tej patologii jest nieprawidłowe stężenie hormonów płciowych, w szczególności estradiolu. Co więcej, wcześniejsze badania wykazały, że jednym z czynników prowadzących do zmniejszenia ilości neuronów jest spadek poziomu estradiolu. Zmniejszenie liczby neuronów „macicznych" w PCG można traktować jako konsekwencję zarówno zapalenia błony śluzowej macicy, jak i zmian poziomu estradiolu [Bulc i in., 2019; Jana i Całka, 2020]. Wykonane w ostatnich czasach badania wykazały, że długotrwałe podawanie estradiolu, jak również testosteronu, wpływa na populację neuronów unerwiających jajnik i prowadzi do zmniejszenia ilości neuronów zaopatrujących jajnik w kompleksie zwoju krezkowego tylnego (CaMG), zwojach pnia współczulnego (SChG), zwojach rdzeniowych korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (DRG) oraz w badanym w niniejszej pracy zwoju PCG [Koszykowska i in., 2011a; Jana i in., 2013, 2013b, 2014; Bulc i in., 2019; Jana i Całka, 2020]. Dokładne badania wykazały, że estrogeny wykazują działanie neuroprotekcyjne, ponieważ chronią komórki nerwowe przed apoptozą. Proces ten jest możliwy dzięki ekspresji receptora dla estrogenów (ER) w komórkach nerwowych [Jana i in., 2013b]. Obecność tych receptorów potwierdzono w neuronach DRG unerwiających macicę [Jana i in., 2012], neuronach unerwiających jajnik świni zlokalizowanych w CaMG [Koszykowska i in., 2011b; Jana i in., 2013], a także w neuronach współczulnych i przywspółczulnych w PCG szczurów i świń [Purves-Tyson i in., 2007; Jana i in., 2013b, 2014]. Ponadto odnotowano zmniejszenie populacji neuronów immunoreaktywnych dla receptora estrogenowego, towarzyszące zmniejszeniu liczby neuronów „jajnikowych" w PCG w odpowiedzi na długotrwałe podawanie estradiolu [Jana i in., 2013]. Z drugiej strony, długotrwała suplementacja testosteronem u loszek prowadzi do wzrostu liczby neuronów zaopatrujących jajniki z jednoczesnym zmniejszeniem całkowitej liczby tego typu neuronów w zwoju PCG [Jana i in., 2014]. Jedną z przyczyn bezpośredniego wpływu zapalenia macicy na zmniejszoną liczbę neuronów unerwiających macicę może być zwiększenie poziomu cytokin prozapalnych w przebiegu zapalenia tego narządu. Należą do nich takie substancje aktywne jak TNF-α, IL-1β czy PGF2α [Gabler i in., 2009; Shao i in., 2012; Jana i in., 2014]. Wszystkie cytokiny spośród wyżej wymienionych są zdolne do generowania wolnych rodników biorących udział w apoptozie neuronów [Hu i in., 1997]. Dlatego zmiana w ilości neuronów PCG unerwiających macicę może być powiązana z wyżej wymienionymi czynnikami (zmiana ekspresji receptorów estrogenowych, jak również zmiany w poziomach mediatorów prozapalnych). Dokładne

poznanie wpływu hormonów steroidowych i czynników prozapalnych, na zmniejszenie liczby neuronów w PCG nie zostało wystarczająco zbadane i wymaga dalszych badań.

Wykorzystanie w niniejszych badaniach podwójnych barwień immunofluorescencyjnych pozwoliło dokładnie określić kodowanie chemiczne neuronów zaopatrujących macicę. Należy podkreślić, że w dyskutowanych badaniach, nie wykazano statystycznie istotnych zmian w neuronach immunoreaktywnych dla DβH-, VIP-, SOM-, nNOS- i NPY między grupą kontrolną, a grupą otrzymującą domaciczny wlew roztworu chlorku sodu. Oznacza to, że operacje chirurgiczne i/lub nakłucia ściany macicy nie mają wpływu na zmiany w immunoreaktywności badanych komórek. Wywołanie stanu zapalnego spowodowało poważne zmiany w kodowaniu chemicznym wstecznie wyznakowanych neuronów. W neuronach adrenergicznych wykazujących immunoreaktywność wobec DβH wykazano immunopozytywną reakcję wobec VIP, SOM, NPY oraz nNOS. Wywołanie stanu zapalnego doprowadziło do wzrostu populacji neuronów zawierających wyżej wymienione substancje. Dodatkowo nastąpiło zwiększenie populacji neuronów immunoreaktywnych wobec VIP, SOM i nNOS, ale nie wykazujących kolokalizacji z DβH. Zmniejszenie ilości neuronów występowało natomiast w obrębie neuronów immunoreaktywnych jedynie wobec DβH, jak również w neuronach nie zawierających żadnej z badanych substancji. Wcześniejsze badania wykazały, że również w populacji neuronów macicznych obecnych na obszarze zwoju CaMG zaobserwowano podobne zmiany w chemizmie neuronów DβH-, VIP- i NPY-pozytywnych [Jana i Całka, 2020a]. Natomiast przedłużone podawanie 17β-estradiolu u dojrzałych płciowo loszek wywołało zmniejszenie populacji neuronów o fenotypie DβH+/VIP+, DβH+/NPY+ i DβH+/SOM+ w neuronach zaopatrujących jajnik w zwoju CaMG, jak również w SChG [Koszykowska i in., 2011a]. Warto zauważyć, że podawanie testosteronu spowodowało wzrost liczby neuronów jajnikowych z ekspresją DβH u niedojrzałych loszek [Jana i in., 2014]. Przeciwstawny efekt wywołał stan zapalny okrężnicy doprowadzając do zmniejszenia neuronów z ekspresją TH, NPY i VIP w neuronach CaMG [Wojtkiewicz i in., 2012]. Podobnie bisfenol A, egzogenna substancja o wysokim powinowactwie do receptora estrogenowego ER-α podawana w niskich dawkach, indukuje zmiany w gęstości włókien nerwowych immunoreaktywnych wobec SOM i nNOS w ścianie macicy [Rytel i in., 2019]. Taka reakcja układu nerwowego w postaci wzrostu ilości struktur nerwowych immunoreaktywnych wobec badanych w niniejszej pracy substancji może wskazywać na istotne właściwości neuroprotekcyjne i przeciwzapalne tych substancji [Morris, 1990;

Delgado i in., 2001, 2002; Abad i in., 2003; Decressac i Barker, 2012; Croce i in., 2012]. Ponadto niektóre z wyżej badanych substancji, jak NPY i SOM, mogą pełnić rolę wspomagającą w procesie usuwania wysięku w objętej stanem zapalnym macicy, ze względu na ich zdolność do zwiększania kurczliwości miometrium [Jana i in., 2010, 2013a]. W aspekcie praktycznym zebrane dane mogą przyczynić się do opracowania nowych metod profilaktyki i leczenia stanów zapalnych macicy. Mogą one również prowadzić do poprawy wskaźników rozrodczych oraz mniejszej liczby zwierząt eliminowanych z hodowli i zwiększenia opłacalności produkcji.

Niniejsze badania po raz pierwszy wykazały zmiany w ekspresji neuroprzekaźników, jak również obecność acetylocholinoesterazy (AChE) w neuronach cholinergicznych unerwiających macicę zlokalizowanych w zwoju PCG dojrzałych płciowo loszek w odpowiedzi na zapalenie tego narządu. Istotne jest, że zawiesinę *E. coli* podawano, gdy loszki znajdowały się we wczesnej fazie lutealnej cyklu rujowego. Pod względem hormonalnym fazę tę charakteryzuje rosnący poziom progesteronu, który ma właściwości immunosupresyjne i sprzyja rozwojowi stanu zapalnego. Dodatkowo, poziomy immunostymulujących leukotrienów, 17β-estradiolu i macicznego PGF2α są znacznie obniżone w tej fazie, co stwarza warunki korzystne dla rozwoju zapalenia [De Winter i in., 1992; Lewis, 2004]. Ponadto w celu identyfikacji populacji neuronów cholinergicznych zastosowano przeciwciała skierowane przeciwko znacznikowi struktur parasympatycznego układu nerwowego jakim jest VAChT. W przypadku neuronów układu przywspółczulnego nie obserwowano zmian istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą otrzymującą płyn fizjologiczny. Istotne statystycznie zmiany zaobserwowano w grupie loch, u których wywołano stan zapalny macicy. Podwójne barwienia z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko VAChT/VIP/SOM wykazały zwiększenie populacji neuronów o fenotypie VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP-, VAChT-/VIP+ oraz VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM-, VAChT-/SOM+, natomiast spadek zaobserwowano w grupie neuronów immunoujemnych zarówno wobec VAChT jak również VIP oraz SOM. W przypadku neuronów nitrergicznych wzrost populacji tych neuronów był obserwowany w grupie perykarionów o fenotypie VAChT-/nNOS+, natomiast spadek w VAChT+/nNOS+. W przypadku populacji ujemnej dla nNOS, lecz dodatniej dla VAChT również zaobserwowano wzrost liczby neuronów, natomiast populacja VAChT-/nNOS- uległa zmniejszeniu w wyniku rozwoju stanu zapalnego. W populacji neuronów galaninowych w grupie kontrolnej oraz grupie z płynem fizjologicznym nie obserwowano neuronów

VAChT+/GAL+ oraz VAChT-/GAL+. Komórki o tym kodzie chemicznym pojawiły się w grupie bakteryjnej. Do tej pory wykazano wpływ licznych substancji i stanów patologicznych na układ nerwowy unerwiający różne struktury układu rozrodczego, zarówno u samic jaki i u samców [Łakomy i in., 1986; Jovanović i in., 1997, 2000; Meller i in., 2016; Jana i in., 2020; Podlasz i Wąsowicz, 2021]. U dojrzałych płciowo loszek obserwowano zmiany w immunoreaktywności jajnikowych neuronów przywspółczulnych w odpowiedzi na długotrwałe podawanie testosteronu i estradiolu. Zmiany te powodowały wzrost poziomu komórek VAChT-/SOM+ i VAChT-/VIP+ oraz spadek populacji VAChT+/VIP-, VAChT+/VIP+, VAChT+/nNOS+ i VAChT+/SOM+ [Jana i in., 2013, 2014].

Kolejne badania przeprowadzone na dorosłych loszkach potwierdziły zmiany w populacjach neuronów jajnikowych immunoreaktywnych wobec VAChT w odpowiedzi na kilka czynników. Należy podkreślić, że w zwoju miednicznym przednim (anterior pelvic ganglion, APG; odpowiednik PCG u samców) w odpowiedzi na jednostronne przecięcie wypustek nerwowych zaobserwowano podwyższenie ilości neuronów cholinergicznych VAChT+/ChAT+ unerwiających pęcherz moczowy, a także neuronów nNOS-, GAL- i VIP-dodatnich [Burliński i in., 2011; Listowska i Pidsudko, 2021]. Natomiast w odpowiedzi na ten sam uraz neurony maciczne PCG nie wykazywały zmian w ekspresji VAChT ani ChAT [Miciński i in., 2021]. Co więcej, inne stany patologiczne takie jak iniekcja do pęcherza moczowego resiniferatoksyny i tetrodotoksyny spowodowały spadek liczby neuronów cholinergicznych jednocześnie immunoreaktywnych wobec nNOS w komórkach nerwowych zwoju PCG zaopatrujących pęcherz moczowy, dodatkowo obserwując wzrost liczby niecholinergicznych, nNOS-dodatnich neuronów, co pokrywa się z naszymi badaniami [Miciński i in., 2021]. Badania nad toksycznością bisfenolu A w odniesieniu do układu rozrodczego, szczególnie macicy, potwierdziły istotny wpływ tej substancji na liczbę włókien nerwowych macicy, w których nastąpiło znaczące zwiększenie populacji wypustek nitrergicznych, zarówno w przypadku małych, jak i dużych dawek bisfenolu [Rytel i Gonkowski, 2020].

W przeprowadzonych badaniach wykonano histochemiczne barwienia zmodyfikowaną metodą Karnovsky'ego-Rootsa w celu wykazania obecności neuronów cholinergicznych. Do tej pory aktywność AChE u świń zidentyfikowano we włóknach nerwowych jajników, jajowodów, rogów macicy i pochwy [Łakomy i in., 1986]. Analiza ilościowa uzyskanych wyników wykazała statystycznie istotny spadek neuronów silnie

zabarwionych VAChT z jednoczesną ekspresją AChE w grupie świń, którym podano *E. coli*. Chociaż bezpośredni mechanizm tego zjawiska nie jest znany, można postawić hipotezę, że neurony cholinergiczne reagują zmniejszeniem ekspresji AChE, co przekłada się na wzrost poziomu acetylocholiny w cholinergicznych zakończeniach nerwowych, jako że badany enzym jest odpowiedzialny za degradację neuroprzekaźnika [Rienda i in., 2021]. Ponadto wcześniej wykazano, że aktywność AChE zmienia się w jajnikach w zależności od fazy cyklu rujowego, i poziomów hormonów steroidowych [Łakomy i in., 1984]. Podczas fazy lutealnej poziom działającego immunosupresyjnie progesteronu wzrasta, a stężenia oddziaływujących immunostymulująco estradiolu i PGF2α zmniejszają się. Wcześniejsze badania wykazały, że podanie bakterii do rogów macicy u loszek obniżało stężenie progesteronu [Jana i in., 2004]. Inne badania wykazały natomiast, że iniekcje estradiolu i progesteronu doprowadziły do wzrostu aktywności AChE w jajnikach, jajowodach i rogach macicy [Łakomy i in., 1986]. Stwierdzono również, że długość fazy lutealnej może ulec wydłużeniu w przypadkach przewlekłych infekcji macicy u klaczy, często połączonych z ropnym zapaleniem, ze względu na niewystarczającą produkcję PGF2α, która jest niezbędna do luteolizy [Hughes i in., 1979]. Tak więc wspomniane różnice w poziomie progesteronu i estradiolu występujące w przebiegu zapalenia macicy można traktować jako istotny czynnik prowadzący do obniżenia ekspresji AChE.

Obecne wyniki wykazały zwiększenie ekspresji neuronów zawierających ACh na terenie zwoju PCG w odpowiedzi na zapalenie błony śluzowej macicy. Wcześniejsze badania wykazały, że ACh wywiera działanie rozszerzające naczynia w macicy kawii domowych i szczurów [Jovanović i in., 1997; Lamireau i in., 2002] oraz odgrywa istotną rolę w zwiększaniu kurczliwości macicy loszek [Jana i in., 2019, 2020c]. Ostatnie badania nad wpływem ACh na kurczliwość mięśniówki zapalnej macicy potwierdziły jej właściwości zwiększające częstotliwość skurczów przy jednoczesnym zmniejszeniu amplitudy. Działanie to wiązało się z aktywacją receptorów muskarynowych typu 2 (MR2) i 3 (MR3). Można zakładać, że jest to spowodowane zmianami ekspresji tych receptorów w odpowiedzi na stan zapalny lub może wynikać ze zmian ich wrażliwości [Jana i in., 2020c]. Należy zauważyć, że spadek amplitudy mógł również wynikać ze zwiększonego efektu ACh i wzmożonej produkcji substancji rozluźniających mięśniówkę macicy, takich jak NO [Jana i in., 2019, 2020c]. Ponadto zakończenia nerwów przywspółczulnych obecnych w macicy mogą być źródłem NO w macicy objętej stanem zapalnym, co zostało wcześniej potwierdzone w innych narządach objętych stanem zapalnym [Gańko i Całka,

2014; Rytel i Całka, 2016]. Oprócz wpływu na kurczliwość, ACh wpływa na aktywność wydzielniczą macicy w warunkach fizjologicznych [Jana i in., 2019]. Fakt ten może sugerować, że ACh odgrywa również rolę w mechanizmach wydzielniczych w macicy objętej stanem zapalnym. Warto nadmienić, że populacja neuronów wykazujących ekspresję badanych neuroprzekaźników w neuronach cholinergicznych PCG była mniejsza niż w neuronach adrenergicznych. Co więcej, cała populacja ACh-dodatnia jest znacznie mniejsza pod względem ilościowym niż populacja komponenty współczulnej [Miciński i in., 2021].

Jednym z ważniejszych czynników mającym wpływ na plastyczność układu nerwowego zaopatrującego układ rozrodczy samic jest zmienny poziom hormonów płciowych, który jak opisano powyżej, zmienia się również w przebiegu stanów zapalnych toczących się obrębie tego układu. Wiele neuropeptydów, podobnie jak hormony płciowe, posiada właściwości, które mogą modulować rozwój i przebieg stanu zapalnego. Takie właściwości posiada m.in. badany w niniejszej pracy VIP. Dodatkowo, neuropeptyd ten odgrywa rolę w regulacji kurczliwości oraz zwiększa przeżywalność neuronów w stanach patologicznych, takich jak stany zapalne [Bryman i in., 1989; Palus i in., 2021]. Inny badany w niniejszym doświadczeniu peptyd SOM zwiększa z kolei ruchliwość i proliferację komórek endometrium [Jana i in., 2020b]. Co więcej, niedawno odkryto, że SOM wpływa na aktywność skurczową macicy w stanie zapalnym poprzez zwiększenie amplitudy i zmniejszenie częstotliwości [Annunziata i in., 2012; Jana i in., 2020b]. Również tlenek azotu jest znany ze swoich właściwości neuroprotekcyjnych, zarówno w ośrodkowym, jak i jelitowym układzie nerwowym [Calabrese i in., 2007]. Chociaż badania nad zwojem PCG niedojrzałych płciowo świń nie wykazały obecności w nim perykarionów nitrergicznych [Wąsowicz i in., 2002] to analizy wykonane na szczurach i świniach wskazują, że nitrergiczne włókna nerwowe zaopatrujące rogi macicy mogą pochodzić ze wspomnianego zwoju [Papka i in., 1995; Miciński i in., 2021]. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują na obniżenie liczby komórek cholinergicznych, ale podwyższenie poziomu adrenergicznych neuronów immunoreaktywnych w stosunku do nNOS, co może wynikać ze zwiększonego znaczenia neuronów współczulnych wykazujących ekspresję NO w stanie zapalnym. Przedstawione powyżej wyniki pokazują syntezę *de novo* galaniny w populacji neuronów cholinergicznych, w grupie świń, u których dokonano iniekcji *E. coli*. Przyjmuje się, że GAL wykazuje właściwości neuroprotekcyjne podczas urazów mózgu i chorób neurodegeneracyjnych [Weyne i in., 2014]. Co więcej, GAL może modulować aktywność

innych układów neuroprzekaźnikowych, które z kolei wpływają na przekaźnictwo cholinergiczne. Ponadto udowodniono, że GAL stymuluje kurczliwość macicy [Niiro i in, 1998; Jana i in., 2021] oraz zmienia amplitudę i częstotliwość skurczów macicy [Shew i in., 1992; Niiro i in., 1998]. Jak dotąd wykazano, że cholinergiczne neurony z koekspresją GAL istnieją w formacjach mózgowych, takich jak część podstawna przodomózgowia i hipokamp [Miller i in., 1997]. Badania unerwienia macicy u niedojrzałych płciowo świń wykazały brak populacji neuronów wykazujących ekspresję GAL [Wąsowicz i in., 2002]. Natomiast ekspresja tego neuroprzekaźnika w odpowiedzi na aksotomię została już wcześniej opisana. Pojawienie się populacji VAChT+/GAL+ i VAChT-/GAL+ wywołane zapaleniem błony śluzowej macicy może sugerować rosnące zapotrzebowanie na ten neuroprzekaźnik ze względu na jego korzystne dla układu nerwowego właściwości.

Porównując ilościową reakcję współczulnego i przywspółczulnego układu nerwowego w regulacji funkcji zmienionej zapalnie macicy można zauważyć, iż odpowiedź parasympatycznych neuronów cholinergicznych unerwiających macicę na podanie bakterii *E. coli* była procentowo słabiej wyrażona w porównaniu z populacją neuronów sympatycznych wykazującą DβH. Jednakże, liczba neuronów cholinergicznych, ale ujemnych dla pozostałych badanych neuroprzekaźników wykazywała wyraźniejszy wzrost, wskazując na istotne znaczenie ACh w przebiegu zapalenia macicy.

Podsumowując, wyniki przedstawionych analiz wykazały, że indukowany *E. coli* stan zapalny macicy spowodował redukcję liczby zarówno współczulnych jak i przywspółczulnych neuronów PCG unerwiających macicę lochy. Na zaistniałą patologię współczulne, jak również przywspółczulne neurony maciczne PCG zareagowały adaptacyjną zmianą ekspresji badanych substancji biologicznie czynnych wyrażającą się zmianą w proporcjach fenotypów chemicznych tych neuronów. Obserwowane zmiany profilu chemicznego badanych neuronów macicznych świadczą o istotnej roli neurotransmisji chemicznej i gazowej w adaptacji lokalnego układu nerwowego do rozwoju i przebiegu zapalenia macicy u lochy. Dalsze wysiłki badawcze powinny się skupić na poznaniu szczegółowej roli poszczególnych badanych substancji czynnych oraz na poznaniu zależności czynnościowych tych związków z substancjami potęgującymi rozwój stanu zapalnego oraz hormonami pochodzenia jajnikowego.

9. Wnioski

- Neurony zaopatrujące macicę świni zlokalizowane były w części doogonowej zwoju przyszyjkowego z przewagą ilościową w zwoju prawym. Eksperymentalnie wywołany stan zapalny doprowadził do zmniejszenia ilości wstecznie wyznakowanych neuronów unerwiających macicę. Zmniejszenie ilości neuronów występowało zarówno w prawym jak i lewym zwoju.

- Istotne statystycznie zmiany w ilości neuronów immunoreaktywnych wobec badanych substancji obserwowane były w lewostronnym i prawostronnym PCG jedynie w grupie zwierząt, które otrzymały iniekcję bakterii *E. coli*. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy zwierzętami z grupy kontrolnej, a loszkami z grupy otrzymującej płyn fizjologiczny.

- Wyznakowane neurony miały charakter zarówno współczulny wiążąc przeciwciała przeciwko DβH, jak i przywspółczulny wykazując ekspresję VAChT. Ciała komórkowe neuronów współczulnych wykazały koekspresję VIP, SOM, NPY i nNOS. Neurony przywspółczulne wykazywały współwystępowanie z VIP, SOM oraz nNOS.

- Stan zapalny macicy w adrenergicznych neuronach współczulnych PCG spowodował wzrost populacji neuronów o fenotypie DβH+/VIP+, DβH-/VIP+, DβH+/SOM+, DβH-/SOM+, DβH+/NPY+ oraz DβH+/nNOS+ i DβH-/nNOS+. Jednocześnie wystąpił spadek populacji neuronów o następującym wzorze kodowania chemicznego: DβH+/VIP-, DβH-/VIP-, DβH-/SOM-, DβH-/NPY+, DβH-/NPY- oraz DβH+/nNOS- i DβH-/nNOS-.

- Neurony przywspółczulne PCG na stan zapalny macicy zareagowały ilościową zmianą kodowania chemicznego wyrażającą się wzrostem liczby komórek o fenotypie VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP-, VAChT-/VIP+, VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM-, VAChT-/SOM+ oraz VAChT+/nNOS-, VAChT-/nNOS+. Jednocześnie doszło do zmniejszenia liczebności populacji neuronów VAChT-/VIP-, VAChT-/SOM-, VAChT+/nNOS+ oraz VAChT-/nNOS-. Ponadto, w opisywanej grupie zapalnej stwierdzono syntezę *de novo* galaniny i wzrost populacji neuronów o fenotypie VAChT+/GAL+, VAChT+/GAL-, VAChT-/GAL+ oraz zmniejszenie ilości neuronów VAChT-/GAL-.

- W grupie zwierząt kontrolnych oraz zwierząt, którym podano płyn fizjologiczny neurony VAChT-dodatnie wykazywały silne zabarwienie AChE. Zapalenie macicy spowodowało spadek liczby neuronów AChE-dodatnich.

10. Literatura

Abad C., Martinez Juarranz M.G., Arranz A., Leceta J., Delgado M., Gomariz R. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn′s disease. Gastroenterology. 2003; 124:961–971.

Alm P., Aluments J., Hakanson R., Helm G., Owman C., Sjöberg N.O., Sundler F. Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract. Am. J. Obstet. Gynecol. 1980; 136:349–351.

Alm P., Lundberg L.M., Wharton J., Polak J.M. Effects of pregnancy on the extrinsic innervation of the guinea pig uterus. a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. Histochem. J. 1988; 20:414–426.

Alm P., Lundberg L.M., Wharton J., Polak J.M. Organization of the guinea-pig uterine innervation. Distribution of immunoreactivities for different neuronal markers. Effects of chemical- and pregnancy-induced sympathectomy. Histochem. J. 1988; 20:290–300.

Alm P., Owman C., Sjoberg N.O., Stjernquist M., Sundler F. Histochemical demonstration of a concomitant reduction in neural vasoactive intestinal polypeptide, acetylcholinesterase, and noradrenaline of cat uterus during pregnancy. Neuroscience. 1986; 18:713–726.

Annunziata M., Luque R.M., Durán-Prado M., Baragli A., Grande C., Volante M., Gahete M.D., Deltetto F., Camanni M., Ghigo E., et al. Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility. Hum. Reprod. 2012; 27:2117–2129.

Bell C. Dual vasoconstrictor and vasodilator innervation of the uterine arterial supply in the guinea pig. Circ. Res. 1968; 23:279–289.

Bryman I., Norström A., Lindblom B., Dahlström A. Histochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide and its influence on contractile activity in the non-pregnant and pregnant human cervix. Gynecol. Obstet. Investig. 1989; 28:57–61.

Bulc M., Całka J., Meller K., Jana B. Endometritis affects chemical coding of the dorsal root ganglia neurons supplying uterus in the sexually mature gilts. Res. Vet. Sci. 2019; 124:417–425.

Burliński P.J., Gonkowski S., Całka J. Tetrodotoxin- and resiniferatoxin-induced changes in paracervical ganglion ChAT- and nNOS-IR neurons supplying the urinary bladder in female pigs. Acta Vet. Hung. 2011; 59:455–463.

Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield A.D., Giuffrida Stella A.M. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. Nat. Rev. Neurosci. 2007; 8:766–775.

Croce N., Ciotti M.T., Gelfo F., Cortelli S., Federici G., Caltagirone C., et al. Neuropeptide Y protects rat cortical neurons against β-amyloid toxicity and re-establishes synthesis and release of nerve growth factor. ACS Chem Neurosci. 2012;3(4):312–318.

De Winter P.J.J., Verdonck M., De Kruif A., Coryn M., Deluyker H.A., Devriese L.A., Haesebrouck F. The relationship between the blood progesterone concentration at early metoestrus and uterine infection in the sow. Anim. Reprod. Sci. 1996; 41:51–59.

De Winter P.J.J., Verdonck M., De Kruif A., Devriese L.A., Haesebrouck R. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: Prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. Anim. Reprod. Sci. 1995; 37:325–335.

De Winter P.J.J., Verdonck M., de Kruif A., Devriese L.A., Haesebrouck F. Endometritis and vaginal discharge in the sow. Anim. Reprod. Sci. 1992; 28:51–58.

Decressac M., Barker R.A. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. Exp Neurol. 2012; 238:265–72.

Delgado M., Abad C., Martinez C., Juarranz M.G., Arranz A., Gomariz R.P., Leceta J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: Potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. J. Mol. Med. 2002; 80:16–24.

Delgado M., Ganea D. Cutting edge: Is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? J. Immunol. 2001; 166:2907–2912.

Fischer M., Ittah A., Liefer I., Gorecki M. Expression and reconstruction of biologically active human acetylcholinesterase from Escherichia coli. Cell. Mol. Neurobiol. 1993; 13:25–38.

Gabler C., Drillich M., Fischer C., Holder C., Heuwieser W., Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. Theriogenology. 2009; 71:993–1004.

Gańko M., Całka J. Prolonged acetylsalicylic-acid-supplementation-induced gastritis affects the chemical coding of the stomach innervating vagal efferent neurons in the porcinedorsal motor vagal nucleus (DMX) J. Mol. Neurosci. 2014; 54:188–198.

Garfield R.E. Structural studies of innervation on nonpregnant rat uterus. Am. J. Physiol. 1986;251:C41–C54

Gu J., Polak J.M., Su H.C., Blank M.A., Morrison J.F.B., Bloom S.R. Demonstration of paracervical ganglion origin for the vasoactive intestinal polypeptide containing nerves of the rat uterus using retrograde tracing techniques combined with immunocytochemistry and denervation procedures. Neurosci. Lett. 1984; 51:377–382.

Hu S., Peterson P.K., Chao C.C. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. Neurochem Int. 1997; 30:427–31.

Hughes J.P., Stabenfeldt G.H., Kindahl H., Kennedy P.C., Edqvist L.E., Neely D.P., Schalm O.W. Pyometra in the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 1979; 27:321–329.

Huszenica G., Fodor M., Gacs M., Kulcsar M., Dohmen M.J.W., Vamos M., et al. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. Reprod Domest Anim. 1999; 34:237–45.

Inyama C.O., Hacker G.W., Gu J., Dahl D., Bloom S.R., Polak J.M. Cytochemical relationships in the paracervical ganglion (Frankenhauser) of rat studied by immunocytochemistry. Neurosci. Lett. 1985; 55:311–316.

Jana B., Całka J., Palus K. Inflammation changes the expression of neuropeptide Y receptors in the pig myometrium and their role in the uterine contractility. PLoS ONE. 2020;15(7): e0236044.

Jana B., Lata M., Bulc M., Całka J. Long term estradiol-17β administration changes population of the dorsal root ganglia neurons innervating the ovary in the sexually mature gilts. Neuropeptides. 2012; 46:157–65.

Jana B., Rytel L., Czarzasta J., Całka J. Reduction of the number of neurones in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts following testosterone administration. J Neuroendocrinol. 2013; 25:826–38.

Jana B., Całka J. Endometritis changes the neurochemical characteristics of the caudal mesenteric ganglion neurons supplying the gilt uterus. Animals. 2020a; 10:891.

Jana B., Całka J., Bulc M., Czarzasta J. Long-term testosterone administration affects the number of paracervical ganglion ovary-projecting neurons in sexually mature gilts. Neurosci. Res. 2014; 83:89–96.

Jana B., Całka J., Bulc M., Piotrowska-Tomala K.K. Participation of acetylcholine and its receptors in the contractility of inflamed porcine uterus. Theriogenology. 2019; 143:123–132.

Jana B., Całka J., Czajkowska M. The role of somatostatin and its receptors (sstr2, sstr5) in the contractility of gilt inflamed uterus. Res. Vet. Sci. 2020b; 133:163–173.

Jana B., Całka J., Miciński B. Regulatory influence of galanin and GALR/GALR2 receptors on inflamed uterus contractility in pigs. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22:6415.

Jana B., Całka J., Palus K., Sikora M. Escherichia coli-induced inflammation changes the expression of acetylcholine receptors (M2R, M3R and α-7 nAChR) in the pig uterus. J. Vet. Res. 2020c; 64:531–541.

Jana B., Jaroszewski J., Czarzasta J., Włodarczyk M., Markiewicz W. Synthesis of prostacyclin and its effect on the contractile activity of the inflamed porcine uterus. Theriogenology. 2013a; 79:470–485.

Jana B., Jaroszewski J., Kucharski J., Koszykowska M., Górska J., Markiewicz W. Participation of prostaglandin E2 in contractile activity of inflamed porcine uterus. Acta Vet. Brno. 2010; 79:249–259.

Jana B., Kucharski J., Dzienis A., Deptuła K. Changes in prostaglandin production and ovarian function in gilts during endometritis induced by Escherichia coli infection. Anim. Reprod. Sci. 2007; 97:137–150.

Jana B., Kucharski J., Zięcik A. Effect of intrauterine infusion of Escherichia coli on hormonal patterns in gilts during the oestrous cycle. Reprod. Nutr. Dev. 2004; 44:37–48.

Jana B., Palus K., Czarzasta J., Całka J. Long-term estradiol-17β administration changes population of paracervical ganglion neurons supplying the ovary in adult gilts. J. Mol. Neurosci. 2013b; 50:424–433.

Jovanović A., Jovanović S., Urbović L. Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine in pregnant guinea-pig uterine artery. Hum. Reprod. 1997; 12:1805–1809.

Jovanović S., Grbović L., Jovanović A. Pregnancy is associated with altered response to neuropeptide Y in uterine artery. Mol Hum Reprod. 2000; 6:352–60.

Karnovsky M.J., Roots L.A. “Direct-coloring” thicholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. 1964; 12:219–221.

Keast J.R. The autonomic nerve supply of male sex organs—An important target of circulating androgens. Behav. Brain Res. 1999; 105:81–92.

Keast J.R. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. Neuroscience. 1995; 66:655–662.

Keast J.R., Luckensmeyer G.B., Schemann M. All pelvic neurons in male rats contain immunoreactivity for the synthetic enzymes of either noradrenaline or acetylcholine. Neurosci. Lett. 1995; 196:209–212.

Koszykowska M., Całka J., Gańko M., Jana B. Long-term estradiol-17β administration reduces population of neurons in the sympathetic chain ganglia supplying the ovary in adult gilts. Exp Mol Pathol. 2011a; 91:353–61.

Koszykowska M., Całka J., Szwajca P., Jana B. Long-term estradiol-17β administration decreases the number of neurons in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts. J Reprod Dev. 2011b; 57:62–71.

Łakomy M., Doboszyńska T., Dynarowicz I., Kotwica J., Zasadowski A. Changes of AChE activity in ovarian nerves of pigs in different periods of the oestrous cycle: Relationship to ovarian steroids. Gegenbaurs Morphol. Jahrb. 1984; 130:719–731.

Łakomy M., Kaleczyc J., Całka J. The effect of oestradiolum benzoicum and progesterone on AChE activity in the nerves of the female reproductive system of immature pigs. Gegenbaurs Morphol. Jahrb. 1986; 132:333–348.

Lamireau D., Nuyt A.M., Hou X., Bernier S., Beauchamp M., Gobeil F., Lahaie I., Varma D.R., Chemtob S. Altered vascular function in fetal programming of hypertension. Stroke. 2002; 33:2992–2998.

Lewis G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. Anim. Reprod. Sci. 2004;82–83:281–294.

Li J., Micevych P., McDonald J., Rapkin A., Chaban V. Inflammation in the uterus induces phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and substance P immunoreactivity in dorsal root ganglia neurons innervating both uterus and colon in rats. J. Neurosci. Res. 2008; 86:2746–2752.

Listowska Ż., Pidsudko Z. Changes in the neurochemical coding of the anterior pelvic ganglion neurons supplying the male pig urinary bladder trigone after one-sided axotomy of their nerve fibers. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22:2231.

Majewski M. Afferent and efferent innervation of the porcine ovary-sourcesof origin and chemical coding. Acta Acad. Agric. Techcol. Olst. Vet. Suppl. 1997; B24:3–125. (In Polish)

Meller K., Całka J., Palus K., Jana B. Inflammation-induced changes in expression of DβH, SP and GAL in the porcine uterine nerve fibres; Proceedings of the 4th Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction "Central and local Regulations of Reproductive Processes"; Zakopane, Poland. 3–4 February 2016.

Miciński B., Jana B., Całka J. Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Vet. Res. 2021; 17:240.

Miller M.A., Kolb P.E., Raskind M.A. GALR1 galanin receptor mRNA is co-expessed by galanin neurons but not cholinergic neurons in the rat basal forebrain. Brain. Res. Mol. Brain. Res. 1997; 52:121–129.

Mitchell B.S. Morphology and neurochemistry of the pelvic and paracervical ganglia. Histol. Histopathol. 1993; 8:761–773

Morris JL. Neuropeptide Y inhibits relaxations of the guinea pig uterine artery produced by VIP. Peptides. 1990; 11:381–6.

Niiro N., Nishimura J., Hirano K., Nakano H., Kanaide H. Mechanisms of galanin-induced contraction in the rat myome-trium. Br. J. Pharmacol. 1998; 124:1623–1632.

Opsomer G., Gröhn YT., Hertl J., Coryn M., Deluyker H., de Kruif A. Risk factors for post-partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. Theriogenology. 2000; 53:841–57.

Palus K., Całka J., Jana B. Alterations in the relative abundance of the vasoactive intestinal peptide receptors (VPAC1 and VPAC2) and functions in uterine contractility during inflammation. Anim. Reprod. Sci. 2021; 225:106680.

Papka R.E., McNeill D.L., Thompson D., Schmidt H.H.H.W. Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides. Cell Tissue Res. 1995; 279:339–349.

Papka R.E., Traurig H.H., Schemann M., Collins J., Copelin T., Wilson K. Cholinergic neurons of the pelvic autonomic ganglia and uterus of the female rat: Distribution of axons and presence of muscarinic receptors. Cell Tissue Res. 1999; 296:293–305.

Podlasz P., Wąsowicz K. Effect of partial hysterectomy on the neurons of the paracervical ganglion (PCG) of the pig. PLoS ONE. 2021;16: e0245974.

Podlasz P., Wąsowicz K. Neurochemical characteristics of paracervical ganglion in the pig. Vet. Med. 2008; 53:135–146.

Purves-Tyson T.D., Arshi M.S., Handelsman D.J., Cheng Y., Keast J.R. Andro-gen and estrogen receptor mediated mechanisms of testosterone action in malerat pelvic autonomic ganglia. Neuroscience. 2007; 148:92–104.

Richeri A., Viettro L., Chavez-Genaro R., Burnstock G., Cowen T., Brauer M. Effects of infantile/prepubertal chronic estrogen treatment and chemical sympathectomy with guanethidine on developing cholinergic nerves of the rat uterus. J. Histochem. Cytochem. 2002; 50:839–850.

Rienda B., Elexpe A., Tolentino-Cortez T., Gulak M., Bruzos-Cidon C., Torrecilla M., Astigarraga E., Barreda-Gomez G. Analysis of acetylcholinesterase activity in cell membrane microarrays of brain areas as a screening tool to identify tissue specific inhibitors. Analytica. 2021; 2:25–36.

Robertson J., Moll D., Saunders G. Chronic Staphylococcus aureus endometritis in a virgin gilt. Vet. Rec. 2007; 161:821–822.

Rytel L., Gonkowski S., Janowski T., Wojtkiewicz J., Pomianowski A. The effects of Bisphenol a (BPA) on sympathetic nerve fibers in the uterine wall of the domestic pig. Reprod Toxicol. 2019; 84:39–48.

Rytel L., Całka J. Neuropeptide profile changes in sensory neurones after partial prepyloric resection in pigs. Ann. Anat. 2016; 206:48–56.

Rytel L., Gonkowski S. The influence of bisphenol a on the nitrergic nervous structures in the domestic porcine uterus. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21:4543.

Schultzberg M., Hökfelt T., Lundberg J.M., Daalsgard C.J., Elfvin L.G. Transmitter histochemistry of autonomic ganglia. In: Elfvin L.-G., editor. Autonomic Ganglia. Chichester; Wiley, UK: 1983. pp. 205–233.

Shao C.Y., Wang H., Meng X., Zhu J.Q., Wu Y.Q., Li J.J. Characterization of the innate immune response in goats after intrauterine infusion of E. coli using histopathological, cytologic and molecular analyses. Theriogenology. 2012; 78:593–604.

Shew R., Papka R., McNeill D. Galanin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in nerves of the rat uterus: Localization, colocalization, and effects on uterine contractility. Peptides. 1992; 13:273–279.

Silver A. The Biology of Cholinesterases. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 1974.

Swindle M.M., Makin A., Herron A.J., Clubb F.J., Jr., Frazier K.S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012; 109:16612–16617.

Tummaruk P., Kesdangsakonwut S., Prapasarakul N., Kaeoket K. Endometritis in gilts: Reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. Comp. Clin. Pathol. 2010; 19:575–584.

Verma N., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of Sus scrofa (pig) as a model system for proteomic studies. Proteomics. 2011; 11:776–793.

Wąsowicz K., Majewski M., Łakomy M. Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. J. Auton. Nerv. Syst. 1998; 74:13–22.

Wąsowicz K., Podlasz P., Czaja K., Łakomy M. Uterus-innervating neurones of paracervical ganglion in the pig: Immunohistochemical characteristics. Folia Morphol. 2002; 61:15–20.

Wesselmann U., Czakański P.P., Affaitati G., Giamberardino M.A. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: Behavioral characterization in the rat. Neurosci. Lett. 1998; 246:73–76.

Weyne E., Albersen M., Hannan J.L., Castiglione F., Hedlund P., Verbist G., De Ridder D., Bivalacqua T.J., Van der Aa F. Increased expression of the neuroregenerative peptide galanin in the major pelvic ganglion following cavernous nerve injury. J. Sex. Med. 2014; 11:1685–1693.

Wojtkiewicz J., Równiak M., Crayton R., Barczewska M., Bladowski M., Robak A., et al. Inflammation-induced changes in the chemical coding pattern of colon-projecting neurons in the inferior mesenteric ganglia of the pig. J Mol Neurosci. 2012; 46:450–8.

Zoubina E.V., Fan Q., Smith P.G. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. J. Comp. Neurol. 1998; 397:561–571.

Zoubina E.V., Smith P.G. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. Auton. Neurosci. Basic. Clin. 2000; 84:176–185

Artykuły wraz z oświadczeniami autorów

Olsztyn, 10.11.2022 r.

Prof. dr hab. Jarosław Całka
Katedra Fizjologii Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Bartosza Micińskiego pod tytułem „Wpływ stanu zapalnego macicy wywołanego inokulacją bakterii E. coli na kodowanie chemiczne wyznakowanych neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego u świni domowej":

1. Miciński B.; Jana B.; Całka J. Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Veterinary Research. 2022 Sep 10;18(1):342. doi: 10.1186/s12917-022-03406-1.
2. Miciński B.; Jana B.; Całka J. Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts. Animals (Basel). 2022 Jun 29;12(13):1676. doi: 10.3390/ani12131676.

Oświadczam, że udział lek. wet. Bartosza Micińskiego w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (praca 1 – 60%, praca 2 – 60%). Doktorant odegrał pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz korekcie tekstów w odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu powyższych publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji badań i metodologii oraz korekcie manuskryptów.

KIEROWNIK KATEDRY
FIZJOLOGII KLINICZNEJ
prof. dr hab. Jarosław Całka

Prof. dr hab. Jarosław Całka

Olsztyn, 10.11.2022 r.

Prof. dr hab. Barbara Jana
Oddział Biologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w rozprawie doktorskiej lek. wet. Bartosza Micińskiego pod tytułem „Wpływ stanu zapalnego macicy wywołanego inokulacją bakterii E. coli na kodowanie chemiczne wyznakowanych neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego u świni domowej":

1. Miciński B.; Jana B.; Całka J. Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Veterinary Research. 2022 Sep 10;18(1):342. doi: 10.1186/s12917-022-03406-1.
2. Miciński B.; Jana B.; Całka J. Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts. Animals (Basel). 2022 Jun 29;12(13):1676. doi: 10.3390/ani12131676.

Oświadczam, że udział lek. wet. Bartosza Micińskiego w powstaniu powyższych publikacji był wiodący (praca 1 – 60%, praca 2 – 60%). Doktorant odegrał pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz korekcie tekstów w odpowiedzi na recenzje. Mój udział w powstaniu powyższych publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji badań i metodologii, pozyskaniu funduszy oraz korekcie manuskryptów.

Barbara Jana

Prof. dr hab. Barbara Jana

BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE Open Access

Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts

Bartosz Miciński[1*], Barbara Jana[2*] and Jarosław Całka[1]

Abstract

Background: The focus of the study was to examine the impact of the inflamed uterus on the population of the paracervical ganglion (PCG) uterus-innervating perikarya and their chemical coding. Fast Blue retrograde tracer was injected into the wall of uterine horns on the 17th day of the first studied estrous cycle. After 28 days, either *Escherichia coli* suspension or saline was applied to the horns of the uterus, whereas the control group received laparotomy only. Eight days after the above-mentioned procedures, uterine cervices with PCG were collected. Both macroscopic and histopathologic examinations confirmed severe acute endometritis in the *Escherichia coli*-injected uteri. The double immunofluorescence method was used to analyze changes in the PCG populations coded with dopamine-β-hydroxylase (DβH) and/or neuropeptide Y (NPY), somatostatin (SOM), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS).

Results: The use of *Escherichia coli* lowered the total number of Fast Blue-positive neurons. Moreover, an increase in DβH+/VIP+, DβH+/NPY+, DβH+/SOM + and DβH+/nNOS + expressing perikarya was noted. A rise in non-noradrenergic VIP-, SOM- and nNOS-immunopositive populations was also recorded, as well as a drop in DβH-positive neurotransmitter-negative neurons.

Conclusions: To sum up, inflammation of the uterus has an impact on the neurochemical properties of the uterine perikarya in PCG, possibly affecting the functions of the organ.

Keywords: Autonomic nervous system, Chemical coding, Pig, Endometritis, Immunocytochemistry

* Correspondence: bartosz.micinski@uwm.edu.pl; b.jana@pan.olsztyn.pl
[1]Department of Clinical Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn, Poland
[2]Division of Reproductive Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

One of the most common pathologic conditions in domestic animals generating severe economic problems for breeders, such as increased medical costs and deteriorated reproductive indicators, is uterus inflammation. This disease develops in response to non-infectious agents and, more importantly, to bacteriological factors. Mainly occurring after parturition, metritis/endometritis might also be evoked through natural mating or insemination in primiparous animals [1–3]. Its mechanism is based on the problems with uterine involution, often matched with immunological reaction, which consists of an increase in the levels of proinflammatory cytokines and other mediators, including tumor necrosis factor-α, interleukins - IL-1β, IL-6, IL-8, nitric oxide (NO), prostaglandins – PGF2α, PGE2, as well as leukotrienes - LTB4 and LTC4 [4–6].

The paracervical ganglion (PCG; Frankenhauser's ganglion) is an unprecedented formation belonging to the autonomic nervous system. It contains both sympathetic (noradrenergic) as well as a parasympathetic (cholinergic) component and is a part of a larger pelvic plexus innervating organs of the urinary tract and reproductive system [7–9]. The porcine uterus is supplied by nerve terminals from many autonomic and sensory ganglia including the PCG. This has been confirmed in the past with the use of Fast Blue (FB) fluorescent retrograde neuronal tracer, which indicated the existence of uterus-innervating neurons inside the structures of Frankenhauser's ganglion [10]. Studies focusing on the double immunohistochemical staining of PCG perikarya in rats, cats and guinea pigs acknowledged the expression of vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and choline acetyltransferase (ChAT) as markers of cholinergic neurons as well as noradrenaline (NA), tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine beta hydroxylase (DβH) as markers of the noradrenergic nerve cell population [11, 12]. The coexistence of various substances in these types of neurons, including vasoactive intestinal polypeptide (VIP), neuropeptide Y (NPY), galanin (GAL), neuronal isoform of NO synthase (nNOS), somatostatin (SOM), galanin (GAL) and substance P (SP) has been confirmed by other authors [9, 13–18]. Literature on the chemical coding of uterine-innervating populations of nervous cells in the porcine PCG is insufficient [9, 10]. Moreover, there is a total lack of information regarding the impact of metritis/endometritis on the expression of any of these substances in either the noradrenergic or cholinergic neurons in PCG.

Since pigs are embryologically, anatomically and physiologically similar to human beings, their significance in any type of biomedical research, including studies on the reproductive system, is invaluable [19, 20]. The authors intended to acquire data on the pig model which may help both animals and breeders by improving breeding indicators, survivability and profitability. In a broader aspect, the study may be valuable to women suffering from uterus inflammation, as it is hoped that these results will serve as a basis for the development of novel therapeutic agents, such as neurotransmitter analogues that can be administered to humans.

Literature describing the morphology and chemical coding of the uterine-perikarya in relation to the inflammation of the uterus is lacking. The available data show that endometritis in rats caused changed behavior as a probable response to visceral pain, as well as an augmented population of SP-immunoreactive neurons in the sensory ganglia (dorsal root ganglia; DRGs) [21, 22]. Three of the authors' published studies reported that, in gilts, endometritis has an impact on the uterus-supplying neuronal populations. It was first reported that in *Escherichia coli* (E. coli)-evoked inflammation, the number of nerve fibers diminished, including noradrenergic fibers [23]. A subsequent article on the effect of uterine inflammation on sensory ganglia presented results showing decreasing numbers of perikarya in DRGs [24], whereas the most recent article described a drop in the total number of uterine supplying neurons in caudal mesenteric ganglion (CaMG) in response to the same disturbance [25]. Based on these results it may be hypothesized that metritis/endometritis affects the neurochemical properties of uterus-innervating neuronal cells in PCG in sexually mature gilts. Understanding the morphological and neurochemical changes of PCG uterine neurons in response to uterine inflammation may be important for the course and consequences of a pathological process. Therefore, the aim of the current study was to test this hypothesis by an examination of (1) the total number of uterine perikarya, as well as (2) determination of the number of cells expressing DβH and/or VIP, NPY, SOM and nNOS in this ganglion.

Results

The number and distribution of uterine perikarya in the PCG

The most numerous concentrations of uterus-innervating PCG-labeled neurons were identified in the zone of the first 5 centimeters behind the portio vaginalis cervicis, gradually diminishing in the cranial direction. The total number of FB-positive neurons in the E. coli group was lower ($p < 0.001$) than in the control and saline groups (351 ± 9.20 vs. 588 ± 16.70, 610 ± 13.24, respectively). It is worth noting that in all groups left-side paracervical ganglia always had a lower ($p < 0.001$) amount of uterus-innervating perikarya than the right-side ganglia. Moreover, the decrease in the number of left-side neurons after bacterial administration was more significant vs. the control ($p < 0.001$) group than the

saline ($p < 0.01$) group. Additionally, the right-side ganglia of the saline group presented a statistically more significant decrease in the number of the FB-positive neurons than the left-side formations of the same group in relation to the bacteria-treated population (right-side: $p < 0.001$ vs. left-side: $p < 0.01$).

The total number of perikarya, as well as the distinction into left and right-side populations of the PCG perikarya, is depicted in Fig. 1.

The number of uterine-supplying neurons containing DBH, SOM, VIP, NPY and nNOS in the PCG

In comparison to both control and saline groups, the number of DβH+/VIP + uterine perikarya statistically significantly increased in the PCG of the bacteria treated gilts ($p < 0.001$) (Figs. 2A and 3A-H), whereas the DβH-/VIP + population size was augmented ($p < 0.01$) in relation to the saline group (Fig. 2A). Moreover, the numbers of DβH+/VIP- in the E. coli group have noted a decrease ($p < 0.05$) when compared to both control and saline groups (Fig. 2A). The size of the DβH-/VIP- population in E.coli-injected gilts diminished as well in comparison to control ($p < 0.01$) and saline ($p < 0.001$) groups of animals (Fig. 2A). In the PCG of E. coli-injected gilts, the number of DβH+/SOM + neurons was higher than in the control ($p < 0.01$) and saline ($p < 0.05$) groups (Figs. 2B and 3I-P). Furthermore, a rise ($p < 0.01$) was noted in the bacterial group' DβH-/SOM + coded neurons when compared to other groups, whereas a decrease was present in the DβH-/SOM- population in relation to both control ($p < 0.001$) and saline groups ($p < 0.01$) (Fig. 2B). E. coli treatment led to an increase in the population of the DβH+/NPY+ (Fig. 2 C, Fig. 4I-P) compared to other two groups (control group: $p < 0.05$, saline group: $p < 0.01$), although the DβH+/NPY-expressing population decreased ($p < 0.05$) its numbers in relation to the saline group (Fig. 2 C). Uterine inflammation also led to an increase in the number of DβH+/nNOS + neurons in comparison with two other examined groups ($p < 0.001$) (Figs. 2D and 4 A-H), a decrease in DβH+/nNOS- population (control group: $p < 0.05$, saline group: $p < 0.01$), a rise ($p < 0.05$) in the size of DβH-/nNOS + coded perikarya in relation to the control group, and evoked a decrease in the number of DβH-/nNOS- neurons (control group: $p < 0.01$) (Fig. 2D).

The numbers of uterine-supplying perikarya containing DβH and/or VIP, SOM, NPY, nNOS, as well as those lacking the expression of all these neurotransmitters in the PCG of the control, saline-and bacteria treated gilts are presented in Fig. 2.

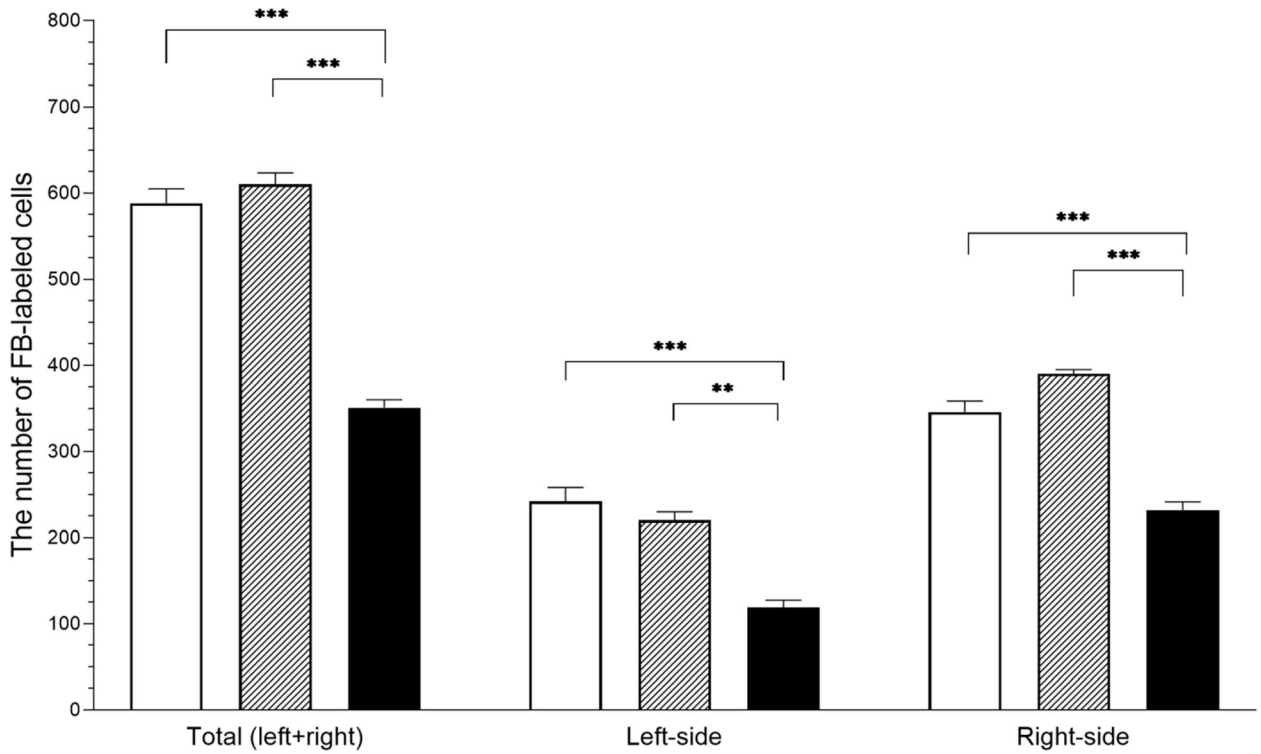


Fig. 1 Total, left-side and right-side perikaryal cell count (mean ± SEM) in the paracervical ganglion (PCG) projecting to the uterus of gilts from the control (white bars), saline (grey bars) and E. coli (black bars) groups (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ show the differences between all groups in the same ganglion region)

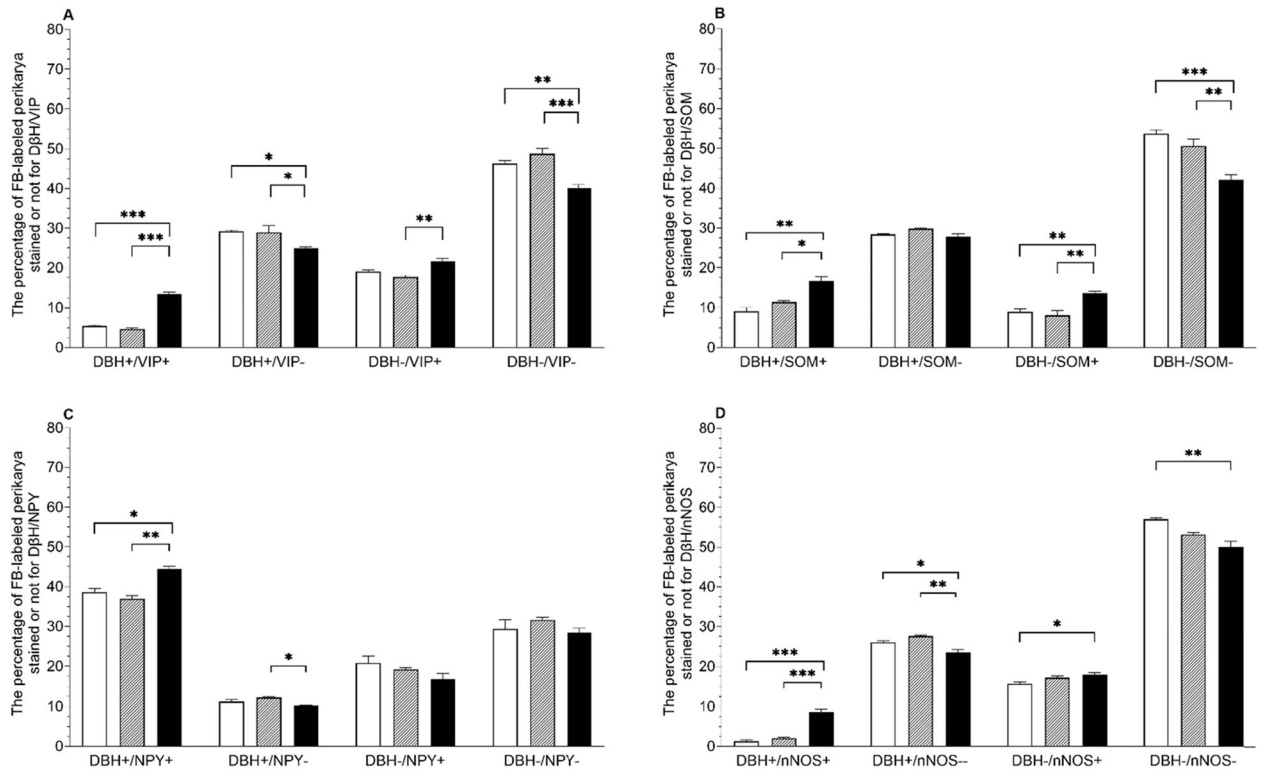


Fig. 2 The populations (expressed as percentages, mean ± SEM) of uterine perikarya expressing dopamine-β-hydroxylase (DβH) and/or vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (**A**), DβH and/or somatostatin (SOM) (**B**), DβH and/or neuropeptide Y (NPY) (**C**) and DβH and/or neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) (**D**), as well as those without these substances in the PCG of gilts from the control (white bars), saline (grey bars) and E. coli (black bars) groups. Data are expressed as percentages of the total population of uterine perikarya stained for two substances in each group, accepted as 100 %. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ show differences between all groups for the same population of uterine perikaryal

Discussion

This is the first study to demonstrate alterations in the number, as well as the chemical coding of the PCG uterus-supplying neurons in sexually mature gilts with the bacteria-induced inflammation of uterus. Inoculation of the E. coli suspension was performed in the early luteal phase of the estrous cycle when the increasing level of immunosuppressive progesterone is conducive to the development of inflammation. Moreover, this action resulted in an incidence of a severe form of acute inflammation since 17β-estradiol (E2), uterine $PGF_{2\alpha}$ and LTs levels (which are considered to have the immunostimulating effect) are very low during this phase [26, 27]. On the microscopic level, such a form is diagnosed when the number of neutrophils is highly increased and luminal epithelium and/or glands are damaged [1]. Such a state was histopathologically proven and the results of such an examination were presented in a previous study by the authors [24]. It is worth noting that saline inoculation did not have a statistically significant impact on the total number of uterine-perikarya or any of the neurons immunoreactive to substances examined in this manuscript. These numbers were fairly similar, which is presented in the results.

The number of uterine perikarya in total was significantly decreased. Such an occurrence has a negative impact on uterus physiology and may imply that, due to innervation degradation, its immunity to inflammation, as well as adaptation capabilities and regulatory potential are impaired. The overall number of uterine neurons in the left-side PCGs was found to be lower than in the right-side in all animals. This finding is in an agreement with earlier studies [10] (for FB tracer injection into the cervical, paracervical and middle part of uterine horns) which found that the number of perikarya was always lower in the left side ganglia. Another significant fact is that since the decrease mentioned above was always more significant on the right-side in comparison to both groups of animals, we can speculate that the right-side neurons of PCG must play a more important role in the innervation of this organ. The fact that uterine inflammation has an impact on the functioning of the reproductive system, like ovaries where it may cause pathologic folliculogenesis, cysts formation or elongate

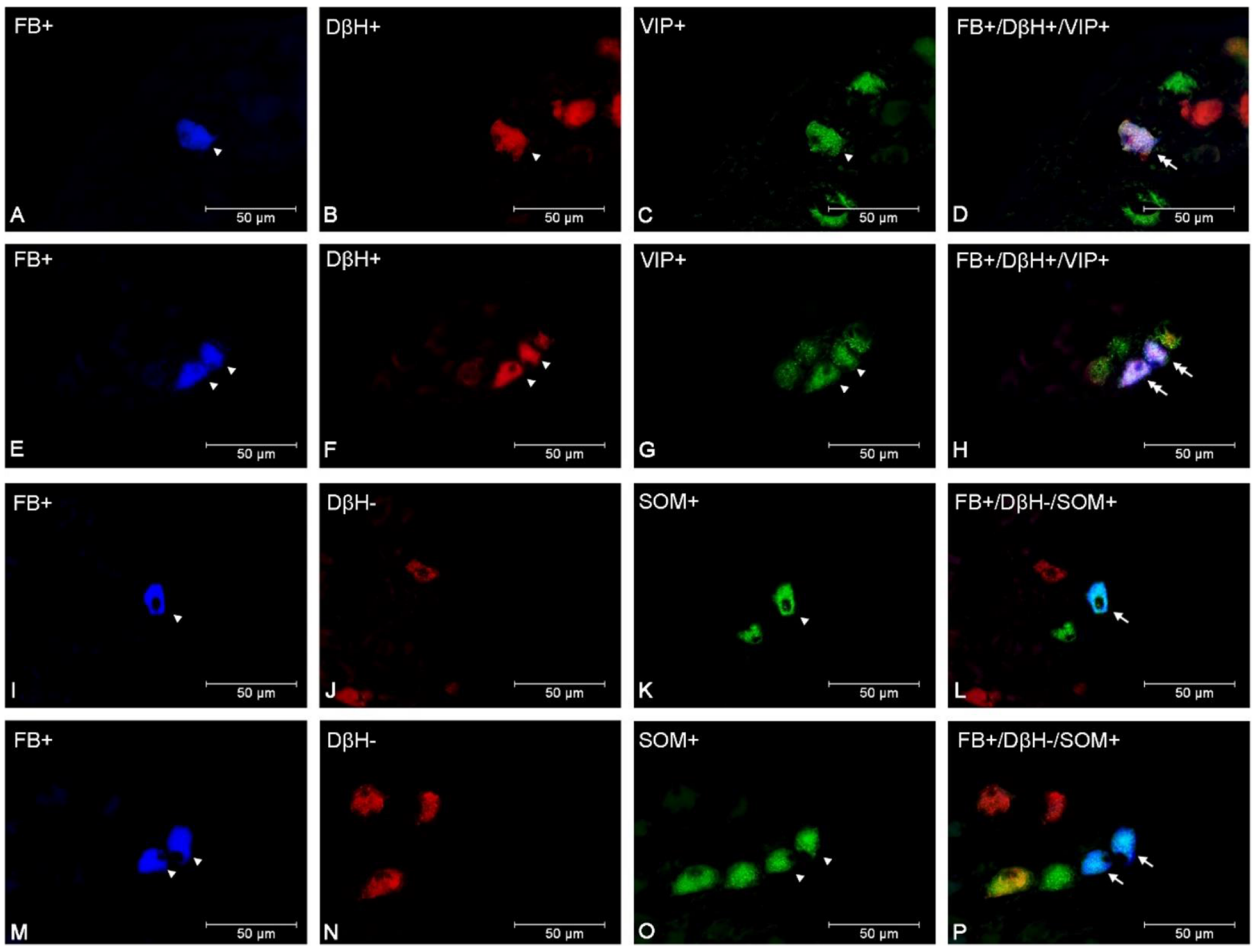


Fig. 3 Micrographs demonstrating the presence of DβH (**B**, **F**, **J**, **N**), VIP (**C**, **G**) and SOM (**K**, **O**) in the PCG uterine perikarya of gilts from the control (**A**-**D**), saline (**I**-**L**) and E. coli (**E**-**H**, **M**-**P**) groups. The arrowhead indicates a Fast Blue (FB)-positive neuron, a perikaryon immunoreactive to DβH and VIP and a perikaryon immunoreactive to SOM. The double arrow indicates an FB-positive uterine neuron expressing DβH and VIP. The arrow indicates an FB-positive perikaryon expressing SOM. The photographs (**D**, **H**, **L**, **P**) were made by digital superimposition of three color channels: FB-positive (blue), DβH-positive (red) and SOM- or VIP-positive (green). One DβH and VIP immunoreactive uterine neuron is visible in the gilt of the control group (**A**-**D**). In the PCG of the E. coli group, an elevated number of perikarya expressing these substances are visible (**E**-**H**). One perikaryon expressing SOM, but not DβH, is present in the ganglion of the saline group (**I**-**L**). In the E. coli group, two perikarya expressing SOM are observed in the PCG (**M**-**P**)

the luteal phase is well known [4, 28, 29]. Therefore, as mentioned in the authors' previous articles on the current study [24, 25], the decrease in the numbers of uterine-perikarya may be treated as a consequence of both the endometritis and the decrease in the E2 level. This may also imply that an increase in the androstenedione level in pigs and cows results from it directly [29–31]. In the last decade, it was revealed that long-term E2 and testosterone administration decreases the number of ovary-innervating paracervical ganglion perikarya in the CaMG [32, 33], sympathetic chain ganglia (SChGs) [34], DRGs [35] and PCG as well [36, 37]. In the available literature, the estrogen role has been determined to be neuroprotective, as it protects neuronal perikarya from fatal damage. Such action is possible due to their ability to activate intracellular signaling pathways, as well as estrogen receptors (ERs) [38, 39]. Such receptors can be commonly found in DRGs neurons innervating the uterus [40], porcine ovary neurons in the CaMG [32], as well as in sympathetic and parasympathetic neurons in the PCG of rats and pigs [36, 41]. Moreover, a decrease in the population of ER-immunoreactive perikarya has been reported as well as a simultaneous drop in the ovarian neuron numbers in PCG in response to a long-term E2 treatment [36]. On the other hand, long-term testosterone supplementation of gilts leads to an increase in the androgen receptor-expressing ovarian perikarya with a simultaneous decrease in the total number of these type of neurons

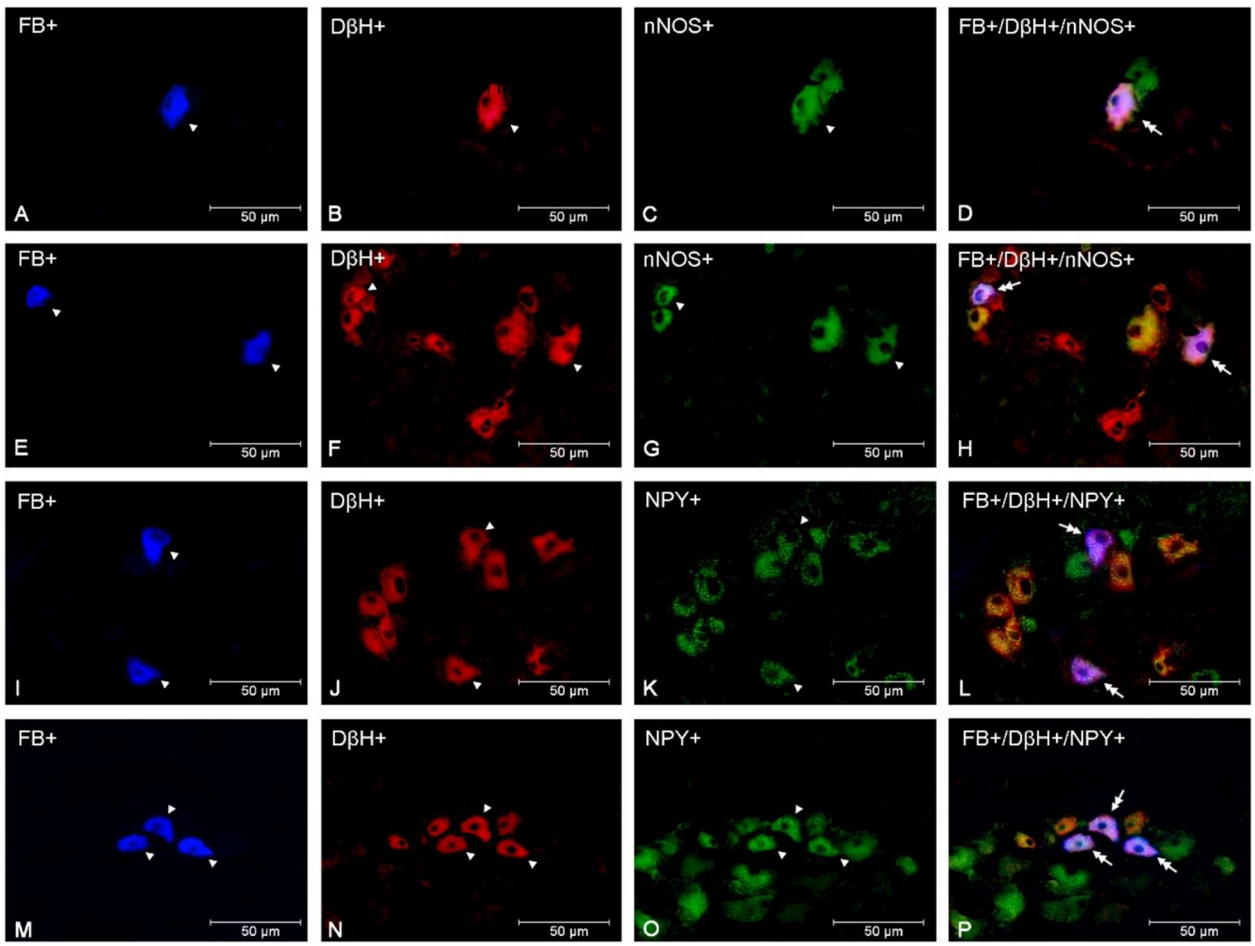


Fig. 4 Micrographs demonstrating the presence of DβH (**B**, **F**, **J**, **N**), nNOS (**C**, **G**) and NPY (**K**, **O**) in the PCG uterine perikarya of gilts from the control (**A**-**D**), saline (**I**-**L**) and E. coli (**E**-**H**, **M**-**P**) groups. The arrowhead indicates a Fast Blue (FB)-positive neuron, a perikaryon immunoreactive to DβH and nNOS/NPY, a neuron immunoreactive to NPY, as well as an nNOS-immunoreactive perikaryon. The double arrow indicates an FB-positive uterine neuron expressing DβH and nNOS/NPY. The photographs were made by digital superimposition of three color channels: FB-positive (blue), DβH-positive (red) and nNOS- or NPY-positive (green). One perikaryon expressing nNOS and DβH is present in the ganglion of the control group (**A**-**D**). In the E. coli group, two perikarya expressing these substances are observed in the PCG (**E**-**H**). Two DβH and NPY immunoreactive uterine neurons are visible in the gilt of the saline group (**I**-**L**). In the PCG of the E. coli group, an elevated number of perikarya expressing these substances are visible (**M**-**P**)

in the PCG [37]. The high probability of direct uterine inflammation impact on the seriously diminished numbers of uterine perikarya may be further supported by multiple reports of higher levels of pro-inflammatory cytokines in the course of uterine inflammation. These include substances such as TNF-α, IL-1β or PGF2α [4–6]. All mentioned cytokines are capable of the generation of free radicals while taking part in neuronal apoptosis [42]. This is why an alteration in uterine-perikarya in PCG can be connected to the above-mentioned facts, and could explain the similar values of estrogen and androgen receptors as well as inflammatory mediators receptors levels for the animals treated with bacterial inoculation. It is important to note that the decrease in PCGs neuronal numbers associated with steroid hormones and pro-inflammatory factors has not been sufficiently studied and requires more research.

Concerning changes in the chemical coding of uterine-perikarya in PCG, there were no statistically significant alterations in DβH-, VIP-, SOM-, nNOS- and NPY-immunoreactive neurons between the control and saline groups. This implies that either surgical actions and/or saline injections do not have any impact on the immunoreactivity of the examined perikarya.

The current study revealed a rise in the number of neuronal populations expressing DβH and VIP, perikarya positive for DβH and SOM, DβH and NPY, as well as DβH and nNOS. An increase was additionally found in neurons DβH-negative but VIP-positive, DβH-

negative but SOM-positive and DβH-negative but NOS-immunoreactive populations. In contrast to that, drops in the number of DβH-immunopositive but VIP-, NPY- and nNOS-negative perikarya, as well as in neurons with no staining to any of the substances were presented. Similar to these results, in the authors' earlier study, a rise in large uterine-supplying, CaMG-located perikarya positive for DβH and VIP, as well as DβH and NPY, was reported [25]. To the contrary, other authors described the number of DβH+/VIP+, DβH+/NPY + and DβH+/SOM + ovary-innervating neurons both in CaMG and SChG decreasing in response to prolonged 17β-estradiol treatment in sexually mature gilts [32, 34]. A decrease in TH, NPY and VIP expressing CaMG-neurons was also presented for chemically induced colitis in pigs [43]. It is worth noting that the testosterone treatment caused an increase in the number of noradrenergic DβH-expressing ovarian neurons in immature gilts [37]. What is more, a recent study on the effects of Bisphenol A, which has a known impact on estrogen receptors, especially ER-α, clearly shows that even small doses of this substance have a measurable impact on the number immunopositive nerve fibers located either in the right or left horn of the porcine uterine body. In this experiment, it is interesting that each uterine area noted a significant increase in populations of DβH and VIP-immunopositive fibers, as well as those positively stained for DβH and nNOS [44]. It is, of course, possible that some part of these are indeed perikaryal terminals of other sympathetic ganglia supplying the uterus, however, it is in line with the current study in which a population of DβH/nNOS-immunoreactive perikarya appears. As these studies are the first to reveal changes in the chemical coding in the PCG of mature gilts, this suggests that such nNOS/DβH-immunopositive neurons appear in animals after sexual maturation, whereas the rise in the E. coli-treated population may be a direct neuronal response to the uterine inflammation. Earlier studies revealed the existence of nNOS-immunoreactive perikarya in co-localization with VAChT [17]. However, a neuronal population immunoreactive to TH in co-localization with nNOS has been described in other studies on the immunohistochemical features of the PCG supplying the oviduct [45] although the animals used in that experiment were not sexually mature.

As mentioned earlier, a decrease in noradrenergic VIP-, SOM- and nNOS-negative perikarya was noted in the bacteria-treated group, which is testified by the results obtained in ovary-innervating neurons of SChGs and CaMG of sexually mature gilts treated with E2 [32, 34], as well as in CaMG uterine-supplying cells from the authors' previous studies [25]. Additionally, a drop in the numbers of DβH negative and NPY positive perikarya similar to the drop found in the current study was also reported in one of the authors' recent studies [25]. Moreover, the non-sympathetic populations expressing VIP, SOM and nNOS in the E. coli group increased in the current study. The mentioned alterations might indicate the disrupted variety of noradrenergic and non-sympathetic mechanisms. It has been proven that noradrenaline, which activates α- and/or β-adrenergic receptors and enhances PGs production, inhibits the contractility of the uterus, either in its physiological or pathological state [46–49]. Similarly, VIP and NPY also play a role in contractility regulation [50, 51]. Moreover, VIP, best recognized due to its anti-inflammatory functions, is also known for its neuroprotective capabilities, which include enhancing neuronal survivability in cells under pathological conditions, such as inflammations [52–54]. NO is also known for its neuroprotective role in both central and enteric nervous systems under optimal conditions [18, 55, 56]. NPY controls the blood flow in vessels and is invaluable due to its neuroprotective properties [57–60]. SOM, on the other hand, is able to adjust motility and cell proliferation in the endometrium [61]. The elevated numbers of VIP, NPY, SOM and nNOS expressing perikarya, either noradrenergic or not, may indicate an increasing demand to upregulate these valuable neurotransmitters in direct response to metritis/endometritis, in order to benefit from their neuroprotective and anti-inflammatory properties. In addition, some of the above-mentioned substances, like NPY and SOM, might have a supportive role in the process of exudate removal in the inflamed uterus due to their contractility-enhancing capabilities. In the practical aspect, the collected data may contribute to the development of new methods of prevention and treatment of uterine inflammations. It might also lead to the improvement of reproductive indicators, as well as fewer animals eliminated from breeding and increased production profitability.

Conclusions

In gilts, uterine inflammation due to E. coli resulted in alterations in numerical and neurochemical patterns of PCG uterine perikarya. Degradation of innervation might point to the fact that this organ's immunity, adaptation capabilities and regulatory potential are all significantly altered. Moreover, various changes in the number of sympathetic or non-sympathetic uterine neurons expressing different neurotransmitters imply that the inflamed state of the examined organ may have a strong impact on such neurons. The obtained results further assure that the pig model is still well-suited for research on the pathological states strictly related to animal breeding, as well as human beings, including studies on

the reproductive system. These results may confirm the sufficient impact of the inflammation on the chemical coding of the involved neurons. Moreover, the expanded knowledge may be utilized to develop new therapeutic analogues of neurotransmitters to help the uterus to return to its normal functioning.

Methods

Animals

The described research was performed on 11 sexually mature, crossbred gilts acquired from the "Wronie" breeding farm located in Wronie, Poland. Each being in the age of 7–8 months and weighing 90–120 kg. The animals showed signs of behavioral estrus, which was confirmed with the use of a tester boar. After unloading, all were randomly divided into 3 subgroups: A – E. coli group ($n = 4$), B – saline group ($n = 3$) and C – control group ($n = 4$), each located in different pens. The animals had three days for adaptation, after which the experiment began. Gilts subjected for the research did not have any disturbances in reproductive processes and were kept in normal laboratory conditions inside the animal quarters of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. Feeding was standard for this species and age and water was available *ad libitum.* All animals were kept in 5 m^2 individual pens, with 14.5 ± 1.5 h of natural light during the day and 9.5 ± 1.5 at night. The temperature was kept at 18 ± 2 °C in accordance with the instructions and agreement of the Local Ethical Committee in Olsztyn, Poland. Stress reaction connected to surgery and the time after was minimized in accordance with Consent no. 65/2015.

Experimental procedures

The procedures were as follows: on day 0 of the experiment (day 17 of the first studied estrous cycle) all animals received premedication consisting of atropine (0.05 mg/kg of body weight /BW/, injected intramuscularly; Atropinum sulf. WZF, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A., Poland), azaperone (2 mg/kg BW, injected intramuscularly Stresnil, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) and ketamine hydrochloride (10 mg/kg BW, injected intravenously; Ketamina, Biowet, Puławy, Poland). General anesthesia was induced with the use of ketamine hydrochloride (10 mg/kg BW, injected intravenously; Ketamina, Biowet, Puławy, Poland). It was then sustained with calculated doses of the same anesthetic (1 mg/kg BW applied after every five minutes, injected intravenously).

The subsequent abdominal incision was used to locate and expose the left and right uterine horns, after which a 5 % aqua solution of FB retrograde fluorescent neuronal tracer (EMS-CHEMIE, GmbH, Germany) was thoroughly injected using a 26-gauge needle of a Hamilton syringe into the wall of both horns. Its tracing capabilities made the bodies of the uterine supplying neurons visible. The tracer was applied into three parts of horns – paracervical, middle and paraoviductal – each treated with 13 separate FB injections (with a 2 cm injection ring diameter, single injection volume 2 μL and total – 26 μL). Due to FB leakage possibility the needle was left stationary for 60 s after each application. Injection areas were further rinsed with isotonic saline and wiped with gauze. The retrograde marker requires 4 weeks to reach the extrinsic sources of innervation.

With 28 days passed, all animals were anesthetized for the second time on the expected day 3 of the third studied estrous cycle using the same procedure as described earlier. Subsequent laparotomy allowed to inject either 50 mL of E. coli suspension (in case of the E. coli group; strain - O25:K23/a/:H1; 109-colony forming units/ml; National Veterinary Research Institute, Department of Microbiology, Puławy, Poland) or 50 mL of saline solution (for the saline group) into each uterine horn, whereas the control group received laparotomy only. On the expected 11th day of the third studied estrous cycle (8 days after laparotomies), all animals were euthanized by an overdose of an intravenously-injected ketamine hydrochloride. Then all animals were perfused with a 4 % buffered paraformaldehyde via the ascending aorta and subjected for PCG collection along with the whole uterine cervix, as well as the ligamentum latum uteri. Moreover, parts of bladders were collected together with cervices to enhance spatial orientation. After collection, the tissues were postfixed by immersion in a fixative for 10 min and then washed with 0.1 M PB (pH 7.4) over the course of 2 days. Finally, these were stored at 4 °C in an 18 % buffered sucrose solution (pH 7.4) with an addition of 0.001 % natrium azide. Until further procedures, the ganglia were kept at -80 °C. In order to determine the form of the inflammation, the fragments of uterine horns were fixed in a 4 % paraformaldehyde solution (pH 7.4) for 24 h, and the tissues were then washed in 0.1 M phosphate buffered-saline (PBS, pH 7.4) and embedded in paraffin. The findings of the uteri histological assessment were published previously [24].

Immunohistochemical analysis

Collected uterine cervices were frozen together with PCG, cut in a cryostat (Frigocut, Reichert-Jung, Nussloch, Germany) into 14 μm thick sections and mounted on chrome alun-coated slides. Using an Olympus BX51 microscope (Olympus, Poland) with an epi-illumination fluorescent microscopy module (V1 module, excitation filter 330–385 nm, barrier filter 420 nm), the presence of FB-positive uterine neurons was checked in the examined sections. All sections with FB-labeled neurons were

subjected to immunohistochemical procedures, which consisted of a routine double-labeling immunofluorescence technique. After air-drying at room temperature for 45 min. and rinsing in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) three times for the duration of 10 min. each, sections were incubated in a blocking buffer containing 10 % of normal goat serum in 0.1 M PBS, 0.1 % donkey serum, 1 % Triton X-100, 0.05 % thimerosal and 0.01 % NaN_3 for 60 min. at room temperature in order to reduce non-specific staining background. Subsequently, after another wash in PBS (three times for 10 min.), the sections were incubated overnight at room temperature with primary antisera against the DβH and/or SOM, VIP, nNOS, and NPY.

The following day sections were rinsed with PBS 5 times for 15 min. and incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546) suspended in PBS containing 0.25 % BSA and 0.1 % Trition X-100 for 1 h to show DβH/SOM, DβH/VIP, DβH/NPY and DβH/nNOS antibody combinations. The exact specifications of antibodies used are presented in Table 1. The sections were then rinsed with PBS three times for 5 min. and covered with a glycerin solution containing DABCO (Sigma, USA). Standard controls, i.e. preabsorption for the neuropeptide antisera with appropriate antigen (20 μg of antigen/ml diluted antiserum) and the omission as well as the replacement of all primary antisera by nonimmune sera, were performed to test immunohistochemical labelling. There was no fluorescence observed in any of these control stainings.

Table 1 Antibodies used for immunostaining procedures

Primary Antibodies				
Antigen	**Code**	**Host Species**	**Dilution**	**Supplier**
DβH	AB1585	rabbit	1:500	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
VIP	ABS 023 – 02	mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
SOM	8330-0009	rat	1:60	Bio-Rad Laboratories, Watford, United Kingdom
NPY	ABS 028-08-02	mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
nNOS	N218	mouse	1:1000	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Secondary Antibodies				
Reagent	**Code**		**Dilution**	**Supplier**
Alexa Fluor 488 nm donkey anti-mouse IgG	A21202		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 nm donkey anti-mouse IgG	A11010		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA

After staining, FB-labeled/double-immunostained neurons were further checked under a fluorescent microscope to count and analyze visible antibody combinations and then photographed with a digital monochromatic camera (Olympus XM 10) connected to a PC. All DβH-, SOM-, VIP-, nNOS- and NPY-immunoreactive and/or all retrograde-labeled cell bodies were counted in every fourth section of the PCG. All uterine perikarya, aside from their diameters, were accepted into one size class. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Statistical analysis

Data gained from PCGs of control ($n = 4$), saline ($n = 3$)- and bacteria ($n = 4$) -treated gilts, was averaged per total number of ganglion perikarya, the population of nerve cells in left- and right-side ganglia and perikarya with particular chemical coding for each group. Data are expressed as percentages of the total population of uterine perikarya stained for two substances in each group, accepted as 100 %. To calculate the standard error of mean (± SEM), a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test was used. All statistical analyses were performed using Statistica 13 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, United States). The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Abbreviations

PCG: Paracervical ganglion; DβH: Dopamine-β-hydroxylase; NPY: Neuropeptide Y; SOM: Somatostatin; VIP: Vasoactive intestinal polypeptide; nNOS: Neuronal isoform of nitric oxide synthase; E. coli: *Escherichia coli*; IL: Interleukins; NO: Nitric oxide; PG: Prostaglandin; LT: Leukotriene; VAChT: Vesicular acetylcholine transporter; ChAT: Choline acetyltransferase; NA: Noradrenaline; TH: Tyrosine hydroxylase; NANC: Non-adrenergic, non-cholinergic; GAL: Galanin; SP: Substance P; DRGs: Dorsal root ganglia; CaMG: Caudal mesenteric ganglion; FB: Fast-Blue; PBS: Phosphate buffer solution; ER: Estrogen receptor; TNF: Tumor necrosis factor

Acknowledgements

We thank Andrzej Pobiedziński and Joanna Kalinowska for their assistance.

Authors' contributions

Conceptualization, B.J. and B.M.; methodology, B.J.; formal analysis, B.M.; investigation, B.M. and B.J.; resources, B.J. and J.C.; data curation, B.M.; writing—original draft preparation, B.M.; writing—review and editing, B.J. and J.C.; visualization, B.M.; supervision, B.J. and J.C.; project administration, B.J.; funding acquisition, B.J. and J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The research was funded by the National Science Center, Poland (grant No. 2014/15/B/NZ5/O3572). Project financially co-supported by the Ministry of Science and Higher Education in the range of the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN, which will cover the publication charges.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Procedures were carried out respecting the relevant Polish and EU legislation concerning Animal Protection and Welfare (Leg. Decree 26/2014 implementing the EU directive 2010/63/EU). Written informed consent to use the animals in our procedures was obtained from the owner. The procedures were approved and permission for specimens collection granted by the Local Ethics Committee of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Consent no. 65/2015), affiliated to the National Ethics Commission for animal experimentation (Polish Ministry of Science and Higher Education).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Received: 24 February 2021 Accepted: 30 June 2021
Published online: 10 July 2021

References

1. De Winter PJJ, Verdonck M, De Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck R. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: Prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. Anim Reprod Sci. 1995;37:325–35.
2. Robertson J, Moll D, Saunders G. Chronic Staphylococcus aureus endometritis in a virgin gilt. Vet Rec. 2007;161:821–2.
3. Tummaruk P, Kesdangsakonwut S, Prapasarakul N, Kaeoket K. Endometritis in gilts: Reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. Comp Clin Pathol. 2010;19:575–84.
4. Jana B, Czarzasta J, Jaroszewski J. Synthesis of leukotrienes in porcine uteri with endometritis induced by infection with Escherichia coli. Reprod Fertil Dev. 2014;26:1007–16.
5. Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. Theriogenology. 2009;71:993–1004.
6. Shao CY, Wang H, Meng X, Zhu JQ, Wu YQ, Li JJ. Characterization of the innate immune response in goats after intrauterine infusion of E. coli using histopathological, cytologic and molecular analyses. Theriogenology. 2012; 78:593–604.
7. Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. Neuroscience. 1995;66:655–62.
8. Keast JR. The autonomic nerve supply of male sex organs – an important target of circulating androgens. Behav Brain Res. 1999;105:81–92.
9. Wasowicz K, Podlasz P, Czaja K, Łakomy M. Uterus-innervating neurones of paracervical ganglion in the pig: immunohistochemical characteristics. Folia Morphol. 2002;61(1):15–20.
10. Wasowicz K, Majewski M, Lakomy M. Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. J Auton Nerv Syst. 1998;74:13–22.
11. Keast JR, Luckensmeyer GB, Schemann M. All pelvic neurons in male rats contain immunoreactivity for the synthetic enzymes of either noradrenaline or acetylcholine. Neurosci Lett. 1995;196:209–12.
12. Mitchell BS. Morphology and neurochemistry of the pelvic and paracervical ganglia. Histol Histopathol. 1993;8:761–73.
13. Alm P, Aluments J, Hakanson R, Helm G, Owman Ch, Sjöberg NO, et al. Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract. Am J Obstet Gynecol. 1980;136:349–51.
14. Gu J, Polak JM, Su HC, Blank MA, Morrison JFB, Bloom SR. Demonstration of paracervical ganglion origin for the vasoactive intestinal polypeptide containing nerves of the rat uterus using retrograde tracing techniques combined with immunocytochemistry and denervation procedures. Neurosci Lett. 1984;51:377–82.
15. Inyama CO, Hacker GW, Gu J, Dahl D, Bloom SR, Polak JM. Cytochemical relationships in the paracervical ganglion (Frankenhauser) of rat studied by immunocytochemistry. Neurosci Lett. 1985;55:311–6.
16. Schultzberg M, Hökfelt T, Lundberg JM, Daalsgard CJ, Elfvin LG. Transmitter histochemistry of autonomic ganglia. In: Elfvin L-G, editor. Autonomic ganglia. Chichester: Wiley; 1983. pp. 205–33.
17. Podlasz P, Wasowicz K. Neurochemical characteristics of paracervical ganglion in the pig. Vet Med. 2008;53:135–46.
18. Burliński PJ, Gonkowski S, Całka J. Tetrodotoxin- and resiniferatoxin-induced changes in paracervical ganglion ChAT- and nNOS-IR neurons supplying the urinary bladder in female pigs. Acta Vet Hung. 2011;59:455–63.
19. Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of Sus scrofa (pig) as a model system for proteomic studies. Proteomics. 2011; 11:776–93.
20. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109:16612–7.
21. Wesselmann U, Czakanski PP, Affaitati G, Giamberardino MA. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: Behavioral characterization in the rat. Neurosci Lett. 1998;246:73–6.
22. Li J, Micevych P, McDonald J, Rapkin A, Chaban V. Inflammation in the uterus induces phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and substance P immunoreactivity in dorsal root ganglia neurons innervating both uterus and colon in rats. J Neurosci Res. 2008;86:2746–52.
23. Meller K, Całka J, Palus K, Jana B. Inflammation-induced changes in expression of DβH, SP and GAL in the porcine uterine nerve fibres. The 4th Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction "Central and local Regulations of Reproductive Processes", Zakopane, Poland, 3–4 February 2016.
24. Bulc M, Całka J, Meller K, Jana B. Endometritis affects chemical coding of the dorsal root ganglia neurons supplying uterus in the sexually mature gilts. Res Vet Sci. 2019;124:417–25.
25. Jana B, Całka J. Endometritis changes the neurochemical characteristics of the caudal mesenteric ganglion neurons supplying the gilt uterus. Animals. 2020;10:891.
26. De Winter PJJ, Verdonck M, De Kruif A, Coryn M, Deluyker HA, Devriese LA, et al. The relationship between the blood progesterone concentration at early metoestrus and uterine infection in the sow. Anim Reprod Sci. 1996; 41:51–9.
27. Lewis GS. Steroidal regulation of uterine immune defenses. Anim Reprod Sci. 2004;82–83:281–94.
28. Huszenica G, Fodor M, Gacs M, Kulcsar M, Dohmen MJW, Vamos M, et al. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. Reprod Domest Anim. 1999;34:237–45.
29. Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. Risk factors for post-partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. Theriogenology. 2000;53:841–57.
30. Peter AT, Bosu WTK. Effects of intrauterine infection on the function of the corpora lutea formed after first postpartum ovulations in dairy cows. Theriogenology. 1987;127:593–609.
31. Jana B, Kucharski J, Ziecik AJ. Effect of intrauterine infusion of Escherichia coli on hormonal patterns in gilts during the oestrous cycle. Reprod Nutr Dev. 2004;44(1):37–48.
32. Koszykowska M, Całka J, Szwajca P, Jana B. Long-term estradiol-17β administration decreases the number of neurons in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts. J Reprod Dev. 2011;57:62–71.
33. Jana B, Rytel L, Czarzasta J, Całka J. Reduction of the number of neurones in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts following testosterone administration. J Neuroendocrinol. 2013;25:826–38.
34. Koszykowska M, Całka J, Gańko M, Jana B. Long-term estradiol-17β administration reduces population of neurons in the sympathetic chain ganglia supplying the ovary in adult gilts. Exp Mol Pathol. 2011;91:353–61.
35. Jana B, Lata M, Bulc M, Całka J. Long term estradiol-17β administration changes population of the dorsal root ganglia neurons innervating the ovary in the sexually mature gilts. Neuropeptides. 2012;46:157–65.
36. Jana B, Palus K, Czarzasta J, Całka J. Long-term estradiol-17β administration changes population of paracervical ganglion neurons supplying the ovary in adult gilts. J Mol Neurosci. 2013;50:424–33.
37. Jana B, Całka J, Bulc M, Czarzasta J. Long-term testosterone administration affects the number of paracervical ganglion ovary-projecting neurons in sexually mature gilts. Neurosci Res. 2014;83:89–96.
38. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. Alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. J Neurosci. 1997;15(17(2):511–5.
39. Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: Implications for neuroprotection. Brain Res Rev. 2001;37:320–34.

40. Papka RE, Workley M, Usip S, Mowa CN, Fahrenkrug J. Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in the uterine cervix, lumbosacral dorsal root ganglia and spinal cord of rats during pregnancy. Peptides. 2006;27:743–52.
41. Purves-Tyson TD, Arshi MS, Handelsman DJ, Cheng Y, Keast JR. Andro-gen and estrogen receptor mediated mechanisms of testosterone action in malerat pelvic autonomic ganglia. Neuroscience. 2007;148:92–104.
42. Hu S, Peterson PK, Chao CC. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. Neurochem Int. 1997;30:427–31.
43. Wojtkiewicz J, Równiak M, Crayton R, Barczewska M, Bladowski M, Robak A, et al. Inflammation-induced changes in the chemical coding pattern of colon-projecting neurons in the inferior mesenteric ganglia of the pig. J Mol Neurosci. 2012;46:450–8.
44. Rytel L, Gonkowski S, Janowski T, Wojtkiewicz J, Pomianowski A. The effects of Bisphenol A (BPA) on sympathetic nerve fibers in the uterine wall of the domestic pig. Reprod Toxicol. 2019;84:39–48.
45. Czaja K, Wasowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Łakomy M. Distribution and immunohistochemical characterisation of paracervical neurons innervating the oviduct in the pig. Folia Morphol. 2001;60(3):205–11.
46. Kitazawa T, Nakagoshi K, Teraoka H, Taneike T. 5-HT(7) receptor and beta(2)-adrenoceptor share in the inhibition of porcine uterine contractility in a muscle layer-dependent manner. Eur J Pharmacol. 2001;433:187–97.
47. Markiewicz W, Jaroszewski JJ. β2-and β3-adrenergic receptors stimulation relaxes porcine myometrium in the peri-implantation period. J Anim Sci. 2016;94:4611–8.
48. Skarzynski DJ, Uenoyama Y, Kotwica J, Okuda K. Noradrenaline stimulates the production of prostaglandin f2alpha in cultured bovine endometrial cells. Biol Reprod. 1999;60:277–82.
49. Quaas L, Zahradnik P. The effects of alpha- and beta-adrenergic stimulation on contractility and prostaglandin (prostaglandins E2 and F2a and 6-keto-prostaglandin F1 alpha) production of pregnant human myometrial strips. Am J Obstet Gynecol. 1985;152:852–6.
50. Bryman I, Norström A, Lindblom B, Dahlström A. Histochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide and its influence on contractile activity in the non-pregnant and pregnant human cervix. Gynecol Obstet Invest. 1989;28:57–61.
51. Jana B, Całka J, Palus K. Inflammation changes the expression of neuropeptide Y receptors in the pig myometrium and their role in the uterine contractility. PLoS ONE. 2020;15(7):e0236044.
52. Delgado M, Ganea D. Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? J Immunol. 2001;166(5):2907–12.
53. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. J Mol Med (Berl). 2002;80(1): 16–24.
54. Abad C, Martinez Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz R. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. Gastroenterology. 2003;124(4): 961–71.
55. Rytel L, Całka J. Neuropeptide profile changes in sensory neurones after partial prepyloric resection in pigs. Ann Anat. 2016;206:48–56.
56. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield AD, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nat Rev Neurosci. 2007;8(10):766–75.
57. Croce N, Ciotti MT, Gelfo F, Cortelli S, Federici G, Caltagirone C, et al. Neuropeptide Y protects rat cortical neurons against β-amyloid toxicity and re-establishes synthesis and release of nerve growth factor. ACS Chem Neurosci. 2012;3(4):312–8.
58. Decressac M, Barker RA. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. Exp Neurol. 2012;238:265–72.
59. Jovanovic S, Grbovic L, Jovanovic A. Pregnancy is associated with altered response to neuropeptide Y in uterine artery. Mol Hum Reprod. 2000;6:352–60.
60. Morris JL. Neuropeptide Y inhibits relaxations of the guinea pig uterine artery produced by VIP. Peptides. 1990;11:381–6.
61. Annunziata M, Luque RM, Durán-Prado M, Baragli A, Grande C, Volante M, et al. Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility. Hum Reprod. 2012;27:2117–29.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



BMC Veterinary Research

CORRECTION

Open Access

Correction: Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts

Bartosz Miciński[1*], Barbara Jana[2*] and Jarosław Całka[1]

Correction: BMC Vet Res 17, 240 (2021)
https://doi.org/10.1186/s12917-021-02949-z

In our BMC Veterinary Research publication [1] entitled 'Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts', we incorrectly described the method of euthanasia. Ketamine (Vetaketam, Vet-Agro, 15 mg/kg i.m.) was given to the pigs as a premedication, which rendered them unconscious. Euthanasia was then performed through an IV overdose of sodium pentobarbital (Morbital 1ml/10kg). Death was confirmed by the determination of lack of pulse, breathing, corneal reflex as well as lack of response to toe pinching and the inability to hear heartbeat and respiratory sounds with the use of a stethoscope.

Published online: 10 September 2022

The original article can be found online at https://doi.org/10.1186/s12917-021-02949-z.

*Correspondence: bartosz.micinski@uwm.edu.pl; b.jana@pan.olsztyn.pl

[1] Department of Clinical Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn, Poland
[2] Division of Reproductive Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland

Reference

1. Miciński B, Jana B, Całka J. Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Vet Res. 2021;17:240. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02949-z.

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

animals

MDPI

Article

Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts

Bartosz Miciński [1,*], Barbara Jana [2,*] and Jarosław Całka [1]

[1] Department of Clinical Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 14, 11-041 Olsztyn, Poland; calkaj@uwm.edu.pl
[2] Division of Reproductive Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland
* Correspondence: bartosz.micinski@uwm.edu.pl (B.M.); b.jana@pan.olsztyn.pl (B.J.); Tel.: +48-89-523-44-61 (B.M.); +48-89-539-31-37 (B.J.)

Simple Summary: Endometritis, both with non-infectious and infectious backgrounds, is one of the most prevalent pathological states among domestic animals. In animals, it generates severe economic problems, including lowered reproductive indices and rising medical treatment costs, and in women, it might lead to severe fertility impairment. In order to determine how the autonomic nervous system responds to such a pathological state, an experimental group of pigs were treated with Escherichia coli injection into the uterine horns, and several ganglions responsible for innervation of this organ were examined, including the paracervical ganglion located on both sides of the broad ligament of the uterus. The results clearly showed a strong impact of the inflammation on the chemical coding of neurons, some even synthesizing neurotransmitters de novo such as the GAL-expressing perikarya. Additionally, applied injections decreased the number of parasympathetic, acetylcholinesterase-expressing neurons implying the importance of the cholinergic population to keep the inflammation under control. The obtained data serve as a basis for the future implementation of modern treatment and enhancements in animal breeding.

Abstract: The focus of this study was based on examining the impact of endometritis on the chemical coding of the paracervical ganglion (PCG) perikaryal populations supplying pig uterus. Four weeks after the injection of Fast Blue retrograde tracer into uterine horns, either the *Escherichia coli* (*E. coli*) suspension or saline solution was applied to both horns. Laparotomy treatment was performed for the control group. Uterine cervices containing PCG were extracted on the eighth day after previous treatments. Subsequent macroscopic and histopathologic examinations acknowledged the severe form of acute endometritis in the *E. coli*-treated gilts, whereas double-labeling immunofluorescence procedures allowed changes to be analyzed in the PCG perikaryal populations coded with vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and/or somatostatin (SOM), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), a neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS), galanin (GAL). The acetylcholinesterase (AChE) detection method was used to check for the presence and changes in the expression of this enzyme and further confirm the presence of cholinergic perikarya in PCG. Treatment with *E. coli* resulted in an increase in VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP−, VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM−, VAChT+/GAL− and VAChT+/nNOS− PCG uterine perikarya. An additional increase was noted in the non-cholinergic VIP-, SOM- and nNOS-immunopositive populations, as well as a decrease in the number of cholinergic nNOS-positive perikarya. Moreover, the population of cholinergic GAL-expressing perikarya that appeared in the E. coli-injected gilts and *E. coli* injections lowered the number of AChE-positive perikarya. The neurochemical characteristics of the cholinergic uterine perikarya of the PCG were altered and influenced by the pathological state (inflammation of the uterus). These results may indicate the additional influence of such a state on the functioning of this organ.

check for updates

Citation: Miciński, B.; Jana, B.; Całka, J. Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts. *Animals* **2022**, *12*, 1676. https://doi.org/10.3390/ani12131676

Academic Editor: Robert M. Friendship

Received: 9 May 2022
Accepted: 28 June 2022
Published: 29 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Keywords: endometritis; cholinergic innervation; paracervical ganglion; uterine neurons; chemical coding; immunocytochemistry; pig

1. Introduction

A female-specific, ganglionic cluster located on both sides of the ligamentum latum uteri, more precisely at the uterovaginal junction, is known as the paracervical ganglion (PCG). The described ganglion constitutes a part of a larger pelvic plexus. It consists of both a sympathetic and parasympathetic component, supplying the reproductive system and urinary tract organs [1–3] with both types of nerve fibers. Moreover, a small population of non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) neurons has been described [4,5]. Its cholinergic neurons are responsible for a variety of parasympathetic actions, such as dilatation of uterine arteries [6]. Earlier studies using Fast Blue (FB) fluorescent neuronal retrograde tracer confirmed that the pig uterus is innervated by terminals originating from many autonomic and sensory ganglia, including PCG [3,7].

Metritis/endometritis developing in response to non-infectious, as well as infectious bacteriological factors, is one of the most prevalent pathological states among domestic animals that alters neurotransmitter secretion in autonomic ganglia such as the above-mentioned PCG. Moreover, although mainly appearing after parturition, it might occur after insemination and natural mating [8–10]. It is characterized by generating severe economic troubles, including lowered reproductive indices and rising medical treatment costs. To demonstrate the presence of AChE activity, affirm the cholinergic phenotype of VAChT-positive neurons, and confirm and help determine the impact of endometritis on neuronal neurotransmitter secretion, a modified Karnovsky–Roots method [11] may be used. Acetylcholinesterase (AChE) is present in the neuromuscular junctions and brain cholinergic synapses, as well as other tissues, and plays a pivotal role in neurotransmission acting by degradation of acetylcholine (ACh). It is a commonly used indicator for cholinergic function in brain tissues [12,13]. There are not any known contraindications to the staining of neuronal bodies; however, according to one concept, AChE-staining should not be used as a reliable marker for cholinergic nerves, as it has been shown to stain sympathetic nerve fibers as well [14–16]. Other authors report no problems with the uterus tissue [17].

Past reports showed the existence of uterus-supplying perikarya inside the pig PCG [7]. Studies focusing on double immunofluorescence staining of PCG neurons in rodents reported populations expressing both choline acetyltransferase (ChAT) and vesicular ACh transporter (VAChT) most often used as cholinergic neurons markers [1,18]. Moreover, other authors confirmed the coexistence of various substances in these types of neurons. The discovered substances include substance P (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), galanin (GAL), a neuronal isoform of NO synthase (nNOS), somatostatin (SOM), and neuropeptide Y (NPY) [3,19–24]. There are insufficient data on the chemical coding of uterine-supplying perikaryal populations in the porcine PCG [3,7]. Interestingly, few data exist on changes in the expression of mentioned substances in cholinergic uterine neurons in PCG for a state such as endometritis.

Studies on rats show that uterine inflammation causes behavior changes, probably in response to visceral pain [25]. Moreover, a rise in the number of SP-positive neurons for sensory dorsal root ganglia (DRG) was recorded [26]. An earlier report showed that bacteria-induced inflammation caused a decrease in the nerve fiber population in the pig uterus, including nerve terminals of the noradrenergic type [27]. Papers concerning the consequences of uterine inflammation on sensory ganglia [28], as well as the caudal mesenteric ganglion (CaMG) [29], showed decreasing numbers of uterine supplying perikarya in both. A recent paper presented a severe decrease in the number of uterine perikarya in the PCG of *Escherichia coli* (*E. coli*)-treated gilts, as well as an impact of endometritis on chemical coding of the sympathetic neurons [30]. Thus, these facts combined allow us to form the

hypothesis that uterine inflammation has a detectable impact on the parasympathetic, uterus-supplying neuronal cells in PCG of sexually mature gilts and alters the expression of various neurotransmitters. For a more in-depth understanding of etiopathogenesis, it is essential to investigate what changes occur in the cholinergic innervation of the inflamed uteri. Since it may be significant for the course and/or outcome of this pathological state, the results may be considered important in the potential improvement of survivability, breeding indicators for animals, and profitability for breeders. The use of a porcine model in any type of biomedical research, including studies on the reproductive system, has already been well-grounded. This type of study is possible due to the essential similarity and comparability to humans [31,32]. In such an aspect, the study may be significant for women suffering from uterus inflammation. These results may be treated as a basis for the introduction of modern, therapeutic measures beneficial to humans as well.

The objective of the following study was to determine the number of uterine perikarya expressing VAChT and/or VIP, GAL, SOM, nNOS, and AChE in the PCG after *E. coli*-evoked uterine inflammation in gilts.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The research material consisted of 11 (n = 11) sexually mature, crossbred gilts showing signs of behavioral estrus, which was confirmed with the use of a tester boar. All gilts weighed from 90 to 120 kgs and were 7–8 months of age; they were separated into either *E. coli* (n = 4), saline (n = 3), or control (n = 4) group. The conditions in which they were kept were thoroughly described in a previous article [30]. It is essential to note that all parameters were set in accordance with the instructions and agreement of the Local Ethical Committee in Olsztyn, Poland, and the authors used all measures necessary to keep the stress reaction to surgery and the post-surgical period at a minimum level, in accordance with Consent no. 65/2015.

2.2. Experimental Procedures

All of the necessary doses, drug trade names, and details for premedication, general anesthesia, surgical treatment, FB, and *E. coli* injection procedures in particular groups, have already been described in one of the authors' previous papers [30]. The procedures are briefly described in what follows.

Premedication administered to the examined gilts on day 0 of the described experiment, which was day 17 of the first studied estrous cycle, consisted of azaperone, injected intramuscularly atropine injected intramuscularly, as well as ketamine hydrochloride, injected intravenously with which general anesthesia was induced and sustained with reapplication after every five minutes and injected intravenously.

An abdominal incision was carried out to expose both uterine horns and inject an aqua solution of FB retrograde fluorescent neuronal tracer. The tracer was thoroughly and evenly spread into the walls of paraoviductal, middle, and paracervical parts of both left and right horns with the use of a Hamilton syringe. In total, 13 separate FB injections were performed in each area. Standard procedures such as a 60 s stationary needle time, as well as gauze rinsing and wiping, were also carried out. Uterus-innervating neurons were visualized via FB. The time to reach innervation sources for this tracer is four weeks.

Gilts were subjected to another anesthesia on day 28, which was the expected third day of the third studied estrous cycle (marking the start of the remaining procedures). The procedures followed were identical to the ones described earlier. A laparotomy allowed applying an *E. coli* suspension and saline solution to the experimental and saline groups. The control group was subjected to laparotomy treatment only. On day 11 of the third studied estrous cycle (marking the period of 8 days after the laparotomies), euthanasia was carried out on all the animals. For this task, an overdose of ketamine hydrochloride injected intravenously was used. Subsequently, an infusion of a 4% buffered paraformaldehyde through the pars ascendens aortae was carried out. Collection of all the ganglia, including

PCG together with the uterine cervix, broad ligament of the uterus, and urinary bladder as orientation guides were performed following the finished paraformaldehyde infusion. Immersive tissue postfixation was carried out immediately after the last step, with a subsequent rinsing using the phosphate buffer performed over the next two days. Lastly, all prepared tissues were stored at 4 °C immersed in a buffered sucrose solution.

Correctly trimmed and prepared tissues containing potential PCG were frozen and kept at −80 °C until further immunohistochemical proceedings. The methods of the precise establishment of the inflammation form, along with the results, were similarly described in the authors' earlier articles [31,33].

2.3. Immunohistochemical Analysis

Tissues were cut into 14 µm sections and subsequently mounted onto the slides coated earlier with chrome alum. The following examination, using a Zeiss AxioImager (Zeiss, Oberkochen, Germany) microscope containing a fluorescent module (V1 module) and appropriate filters (330–385 nm excitation filter and 420 nm barrier filter), of the examined slices allowed us to subject the FB neuron-containing sections to immunohistochemical double-labeling procedures. All of the steps, as well as the required reagents for this method, were thoroughly described in our last article [30]. As this study focuses on the parasympathetic part of the examined ganglion, antibody combinations are the only differing part (Table 1). Standard controls, i.e., pre-absorption for the neuropeptide antisera with appropriate antigen (20 µg of antigen/mL diluted antiserum) and the omission, as well as the replacement of all primary antisera by non-immune sera, were performed to test immunohistochemical labeling. There was no fluorescence observed in any of these control stainings.

Table 1. Antibodies used for immunostaining procedures.

Primary Antibodies				
Antigen	**Code**	**Host Species**	**Dilution**	**Supplier**
VAChT	V5387	rabbit	1:2000	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
VIP	ABS 023-02	mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
SOM	8330-0009	rat	1:60	Bio-Rad Laboratories, Watford, United Kingdom
GAL	T-5036	guinea-pig	1:2000	Peninsula, San Carlos, CA, USA
nNOS	N218	mouse	1:1000	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Secondary Antibodies				
Reagent	**Code**		**Dilution**	**Supplier**
Alexa Fluor 546 nm goat anti-rabbit IgG	A21202		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 nm donkey anti-mouse IgG	A11010		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 nm goat anti-guinea pig IgG	A11073		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 nm donkey anti-rat IgG	A21208		1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA

With staining procedures completed, FB-labeled perikarya were passed for further inspection under the fluorescent microscope in order to count the number and analyze the exposed antibody combinations. Photographs were taken using Zeiss AxioImager.M2's Ax-

iocam 705 digital monochromatic camera. All retrograde-marked neurons expressing either VAChT, SOM, VIP, GAL, or nNOS were counted in every 4th section of the paracervical ganglion. The threshold of the statistically significant differences was set at $p < 0.05$.

2.4. Histochemical Analysis

A modified Karnovsky–Roots method was used to present the activity or lack of AChE in the cholinergic uterus-innervating neurons. Before histochemical procedures, sections with VAChT-immunoreactive perikarya were photographed with a digital monochromatic camera (Zeiss AxioImager, Oberkochen, Germany) connected to a PC, and the coordinates of each photograph were saved in order to locate the same neuron after staining using the aforementioned method.

Sections were then incubated with a clear, green, stable medium consisting of 5 mg of acetylthiocholine iodide dissolved in 6.5 mL 0.1 M sodium hydrogen maleate buffer of pH 6.0, 0.5 mL of 0.1 M sodium citrate, 1 mL of 30 mM $CuSO_4$, 1 ml water, and 1 mL of 5 mM potassium ferricyanide. Other types of cholinesterase activity were inhibited by 0.05 mM tetraisopropyl pyrophosphoramide (iso-OMPA, Sigma, Darmstadt, Germany). The incubation time was 2 h at 37 °C. Sections were then rinsed with gentle agitation for 10 min in distilled water.

After staining, VAChT-IR neurons were further checked under a microscope to count AChE-positive cells and then photographed. AChE-positive perikarya were counted for approximately 50 VAChT positive, uterine-supplying neurons for PCG of each pig.

2.5. Statistical Analysis

The results were acquired from a PCG examination in all three groups of this experiment and averaged per neuron with particular coding for each group. The data are expressed as percentages of the total population of uterine-supplying nerve cells stained for two substances in each group and accepted as 100%. For AChE staining, the data are expressed as a number of positively stained neurons. A one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out using Statistica 13 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) to determine the standard error of the mean (±SEM), followed by the Bonferroni test to validate whether the differences were statistically significant. The threshold was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The Numbers of Uterine-Supplying Neurons Containing VAChT, SOM, VIP, GAL, and nNOS in the PCG

In comparison to both the control and saline groups, the numbers of VAChT+/VIP+ and VAChT+/VIP− uterine perikarya statistically significantly increased in the PCG of the bacteria-treated gilts ($p < 0.001$). VAChT-/VIP+ population increased in control ($p < 0.001$) and saline ($p < 0.05$) groups as well (Figures 1A and 2A–H), whereas the VAChT-/VIP- population size was diminished ($p < 0.001$) in relation to the saline and control groups (Figure 1).

In the PCG of *E. coli*-injected gilts, the number of VAChT+/SOM+ neurons was higher than that of the control and saline ($p < 0.01$) groups (Figures 1B and 2I–P), whereas the population of VAChT-/SOM+ reactive perikarya noted an increase ($p < 0.05$) in comparison to the saline group only. Furthermore, a rise ($p < 0.001$) was noted in the bacterial group' VAChT+/SOM− coded neurons when compared with other groups, whereas a decrease was present in the VAChT-/SOM- population in relation to the control ($p < 0.001$) and saline groups ($p < 0.01$) (Figure 1B). A statistically significant difference was noted between the saline and control groups only in VAChT-/SOM- coded neuronal cells ($p < 0.05$).

E. coli treatment led to an increase ($p < 0.01$) in the population of the VAChT+/GAL− when compared with the other two groups (Figure 1C). Moreover, populations of VAChT+/GAL+ and VAChT-/GAL+ immunoreactive uterus-innervating neurons appeared (Figures 1C and 3A–H) in the bacteria-treated group in relation to two other groups ($p < 0.01$

and $p < 0.001$, respectively). Additionally, the number of VAChT-/GAL- expressing population decreased ($p < 0.001$) in relation to those of both the control and saline groups.

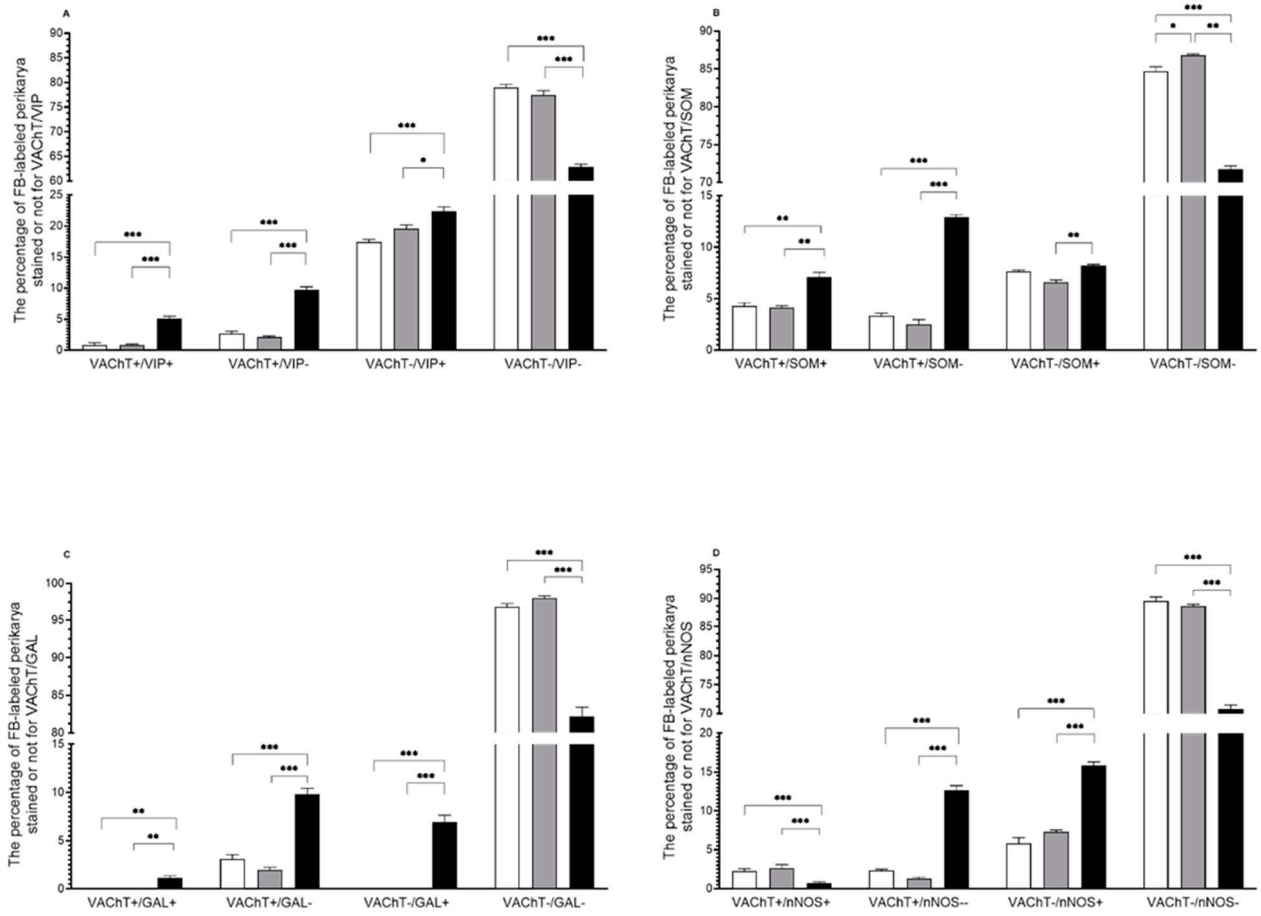


Figure 1. The populations (expressed as percentages, mean ± SEM) of uterine perikarya expressing vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and/or vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (**A**), VAChT and/or somatostatin (SOM) (**B**), VAChT and/or galanin (GAL) (**C**), and VAChT and/or neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) (**D**), as well as those without these substances in the PCG of gilts from the control (white bars), saline (grey bars), and *E. coli* (black bars) groups. Data are expressed as percentages of the total population of uterine perikarya stained for two substances in each group, accepted as 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ show differences between all groups for the same population of uterine perikarya.

Uterine inflammation also led to a decrease ($p < 0.001$) in the number of VAChT+/nNOS+ neurons (Figures 1D and 3I–P) and an increase ($p < 0.001$) in VAChT+/nNOS− and VAChT-/nNOS+ populations in relation to the control and saline groups. Endometritis evoked a decrease ($p < 0.001$) in the number of VAChT-/nNOS- neurons in comparison to other groups (Figure 1D).

Figure 1 presents VAChT- and/or VIP-, SOM-, GAL-, and nNOS-positive uterine-innervating neurons, as well as those not showing the expression of any of these substances in the PCG in any of the three examined groups of gilts.

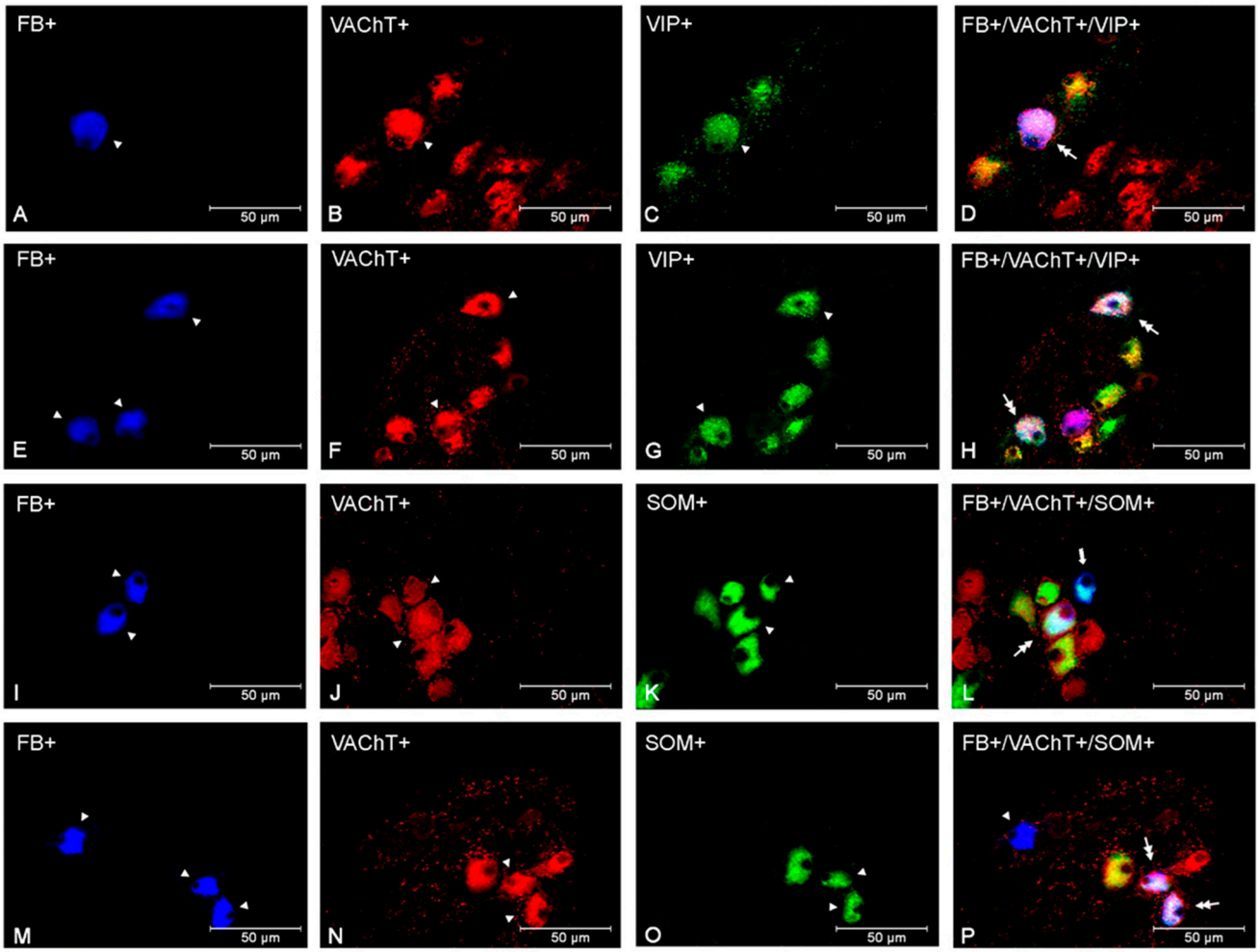


Figure 2. Micrographs demonstrating the presence of VAChT (**B**,**F**,**J**,**N**), VIP (**C**,**G**), and SOM (**K**,**O**) in the PCG uterine perikarya of gilts from the saline (**A**–**D**), control (**I**–**L**), and *E. coli* (**E**–**H**,**M**–**P**) groups. The arrowhead indicates a Fast Blue (FB)-positive neuron, a perikaryon immunoreactive to VAChT, VIP, and a perikaryon immunoreactive to SOM. The double arrow indicates an FB-positive uterine neuron expressing VAChT and VIP and VAChT and SOM. The arrow indicates an FB-positive perikaryon expressing SOM. The photographs (**D**,**H**,**L**,**P**) were made using the digital superimposition of three color channels: FB-positive (blue), VAChT-positive (red), and SOM- or VIP-positive (green). One VAChT and VIP immunoreactive uterine neuron is visible in the gilt of the saline group (**A**–**D**). In the PCG of the *E. coli* group, an elevated number of perikarya expressing these substances are visible (**E**–**H**). One perikaryon expressing SOM and VAChT is present in the ganglion of the control group (**I**–**L**). In the *E. coli* group, two perikarya expressing both of these substances are observed in the PCG (**M**–**P**).

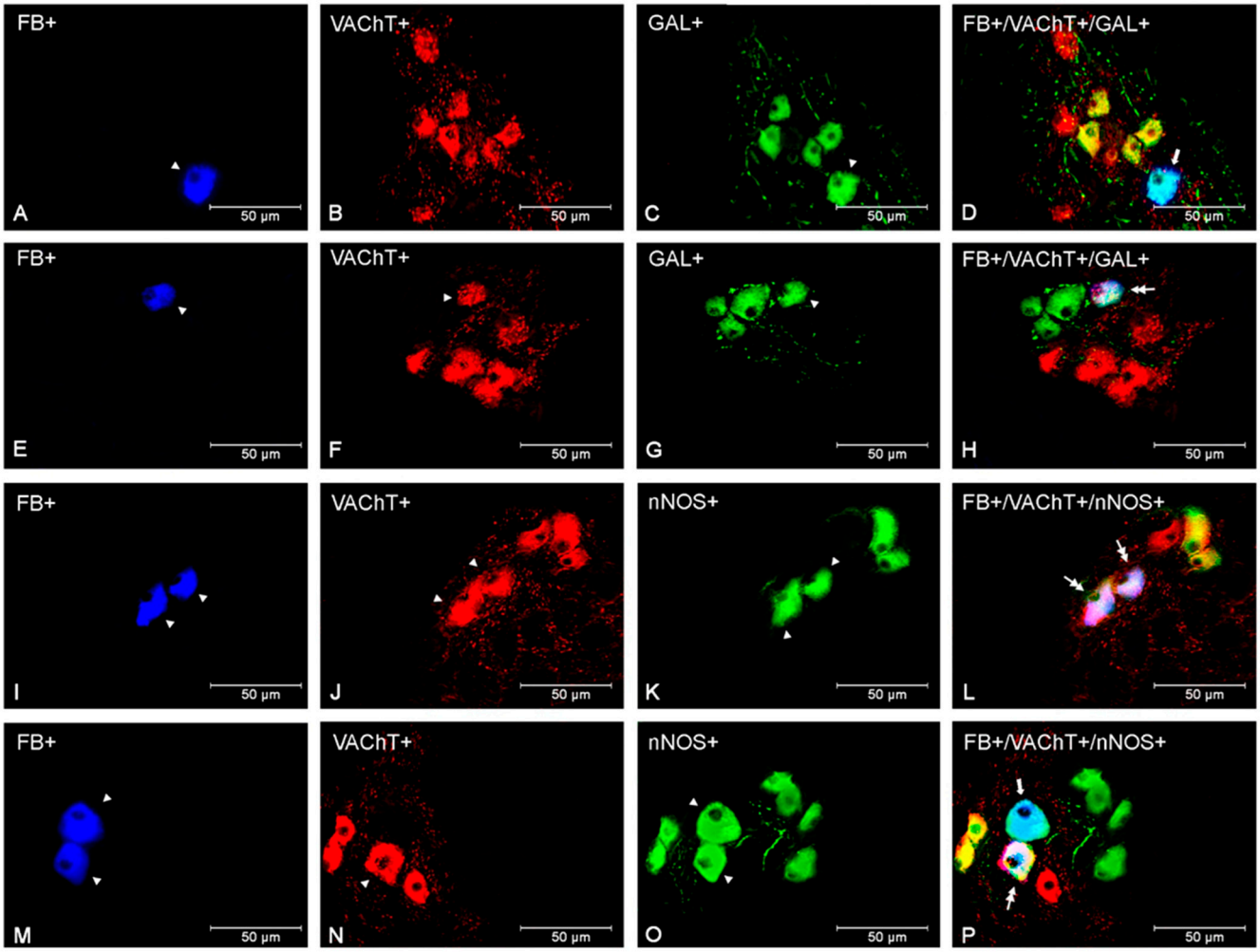


Figure 3. Micrographs demonstrating the presence of VAChT (**B**,**F**,**J**,**N**), GAL (**C**,**G**), and nNOS (**K**,**O**) in the PCG uterine perikarya of gilts from the control (**A**–**D**), saline (**I**–**L**), and *E. coli* (**E**–**H**,**M**–**P**) groups. The arrowhead indicates a Fast Blue (FB)-positive neuron, a perikaryon immunoreactive to VAChT, a neuron immunoreactive to GAL, as well as an nNOS-immunoreactive perikaryon. The double arrow indicates an FB-positive uterine neuron expressing VAChT and GAL/nNOS, whereas the arrow shows an FB-positive and GAL/nNOS immunoreactive neuron. The photographs were made using the digital superimposition of three color channels: FB-positive (blue), VAChT-positive (red), and nNOS- or GAL-positive (green). One perikaryon expressing GAL but not VAChT is present in the ganglion of the control group (**A**–**D**). In the *E. coli* group, a perikaryon expressing these substances is observed in the PCG (**E**–**H**). Two VAChT and nNOS immunoreactive uterine neurons are visible in the gilt of the saline group (**I**–**L**). In the PCG of the *E. coli* group, a decreased number of perikarya expressing these substances are visible (**M**–**P**).

3.2. The Number of Uterine Perikarya Containing AChE in the PCG

A decrease in the number of stained AChE-positive perikarya was noted in the *E. coli*-administered group in relation to the control ($p < 0.05$) and saline ($p < 0.01$) groups (44.50 ± 1.5 vs. 50.50 ± 0.65, 51.33 ± 0.88, respectively) (Figures 4 and 5A–D). In the control and saline groups, all of the VAChT-positive neurons were strongly AChE-stained (thus AChE-expressing), whereas such intensive staining was not present in the *E. coli* group.

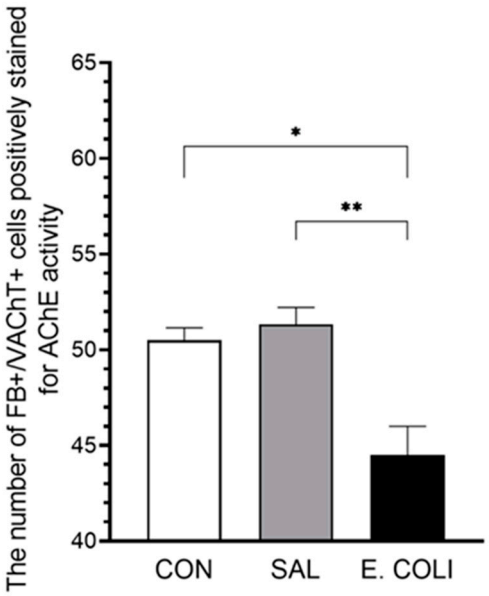


Figure 4. The numbers of both FB- and VAChT-positive neurons positively stained for AChE (mean ± SEM) in the PCG counted in the gilts from control (CON), saline (SAL), and *E. coli* (*E. coli*) groups (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ show the differences between groups).

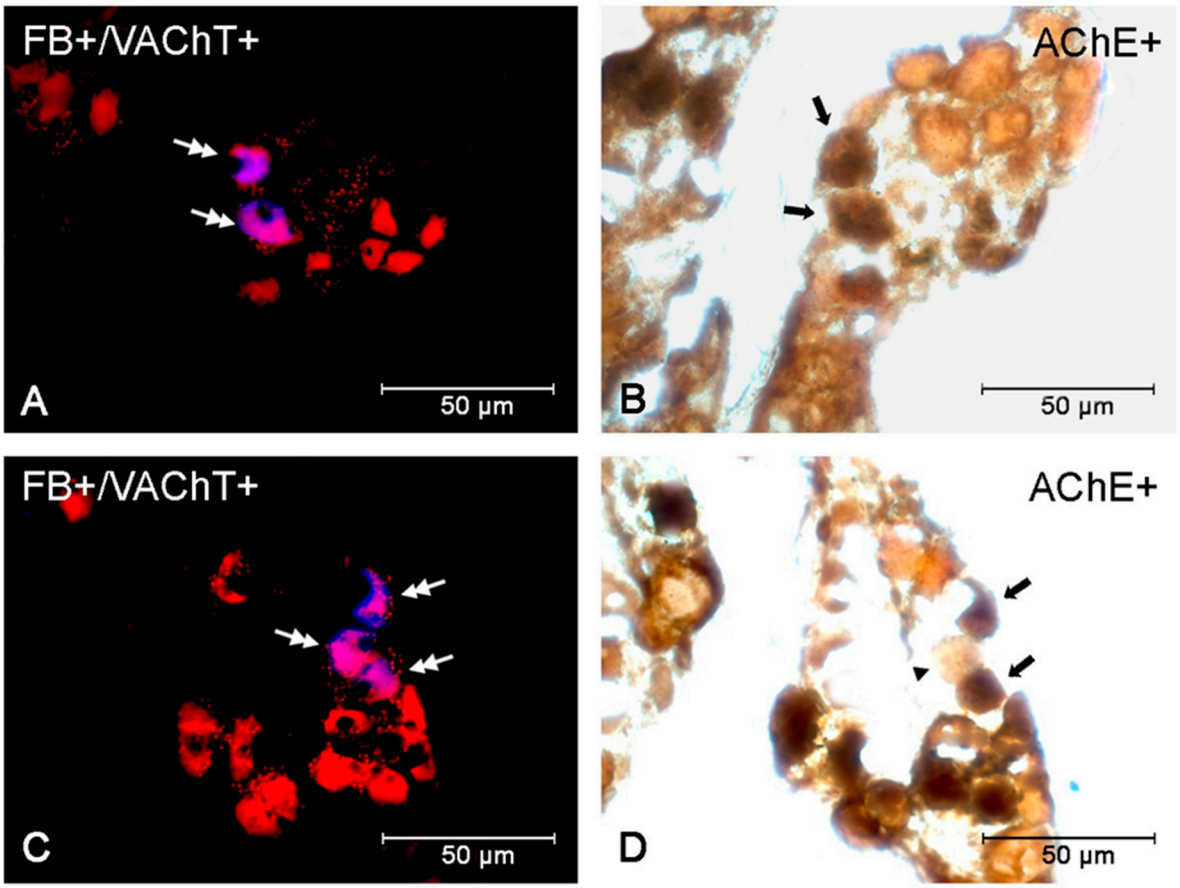


Figure 5. Micrographs demonstrating the presence of uterine, VAChT-positive (**A**,**C**), and AChE (**B**,**D**) expressing perikarya in the PCG of gilts from the saline (**A**,**B**) and *E. coli* (**C**,**D**) groups. The double arrow

indicates an FB-positive neuron expressing VAChT. The arrow indicates an AChE-positive, whereas the arrowhead indicates an AChE-negative perikaryon. Two uterine neurons expressing VAChT and AChE are visible in the gilt of the saline group (**A**,**B**). A decreased number of perikarya expressing AChE are present in the PCG of the bacteria-treated group (**C**,**D**).

4. Discussion

The current study, for the first time, indicated changes in the expression of neurotransmitters and AChE in cholinergic uterine perikarya in the PCG of sexually mature gilts in response to uterus inflammation. *E. coli* suspension was applied when gilts were in the early luteal phase of the estrous cycle. Such a phase is defined by a rising level of progesterone, which has immunosuppressive characteristics and promotes inflammation development. Additionally, levels of immunostimulating LTs, 17β-estradiol (E2), and uterine PGF2α are significantly decreased throughout this phase, further aiding the development of disease [33,34]. A result was the manifestation of a severe form of acute inflammation. Inoculation of the same, as well as a lower quantity of *E. coli*, led to a similar situation in previous studies [35,36]. Essentially, the aforementioned form is diagnosed in the presence of a highly increased number of neutrophils. Additionally, damage to the luminal epithelium and/or gland structures is present [1]. An earlier study confirmed the incidence of this form of inflammation in the examined gilts with the use of histopathological procedures [28].

Neuronal populations showing immunoreactivity to substances studied in this article did not present statistically significant alterations in response to saline inoculation, excluding only the non-cholinergic, somatostatin-negative population. Such an occurrence indicates that surgical procedures and saline injections had no effect on the chemical coding of the examined neurons.

As mentioned in the Results section, in the bacteria-treated group, many statistically significant alterations in chemical coding were observed, with both increases and decreases in the number of specific neuronal populations. Earlier research, focused on the examination of neurotransmitter expression in all PCGs neurons in immature pigs, proved the existence of numerous cholinergic perikarya [23]. Subsequent studies performed on adult gilts confirmed changes in VAChT-immunoreactive populations of ovarian neurons in response to several factors. Similar to the current results, increased levels of VAChT-/SOM+ and VAChT-/VIP+ were noted in response to testosterone treatment, whereas decreases in VAChT-positive but VIP-negative, VAChT-immunoreactive, VIP-, nNOS-, and SOM-immunoreactive were recorded as a result of long-term E2 and testosterone administration [37,38]. Interestingly, upregulation of cholinergic, VAChT+/ChAT+ urinary bladder-innervating perikarya, as well as nNOS-, GAL-, and VIP-positive neurons, was presented in the anterior pelvic ganglion (APG; the male equivalent of PCG) in response to one-sided axotomy [39]. In contrast, in response to the same trauma, PCG uterine neurons presented no changes in VAChT or ChAT expression [40]. Both studies were, however, performed on immature animals. Moreover, resiniferatoxin and tetrodotoxin induced a drop in cholinergic, nNOS-immunoreactive urinary-bladder-supplying neuronal cells in PCG with an additional increase in non-cholinergic, nNOS-positive perikarya, similar to the current findings [24]. Studies on ER-impacting Bisphenol A confirmed a measurable impact on the number of uterine nerve fibers, in which it significantly increased the population of nitrergic nerves in either low or high doses [41].

To date, AChE activity has been identified in the nerve fibers of pigs' ovaries, oviducts, uterine horns, and vagina [42]. Interestingly, the current results showed a statistically significant decrease in strongly stained AChE-expressing, VAChT+ neurons in the *E. coli* group. Although the direct mechanism is not known, it may be hypothesized that, in order to consolidate the demand for ACh and its properties and maximize its concentration in the nerve terminals, cholinergic neurons respond with a limitation of the AChE expression, as the examined enzyme is responsible for degradation of the acetylcholine neurotransmitter, thus bringing an end to cholinergic neurotransmission [43]. Moreover, it has been

previously proven that AChE activity changes in ovaries in different phases of the estrous cycle, when steroid hormone levels fluctuate [44]. During the luteal phase, the immunosuppressive progesterone level rises, and the immunostimulating E2 and PGF2α levels decrease, as mentioned earlier in the Discussion section. Previous studies have shown that bacterial injections into uterine horns of gilts subsequently lowered P4 concentration [45]. Other studies have shown that E2 and P4 injections resulted in increased AChE activity in ovaries, oviducts, and horns, whereas they caused a decrease in enzyme activity in the cervix E2 [42]. It was also reported that the luteal phase length might elongate in cases of chronic uterine infections in the mare, often combined with a pyometra, due to insufficient PGF2α production necessary for luteolysis [46]. Thus, the aforementioned P4 and E2 concentration differences appearing in the course of the inflamed uterus may be treated as part of the discussed mechanism leading to a decreased AChE expression.

In physiological conditions, the plasticity of the nervous system supplying the reproductive tract is associated with changes in uterine innervation density occurring during the course of the estrous cycle and pregnancy [47–52], whereas the earlier mentioned fluctuations in various neurotransmitters of either cholinergic or non-cholinergic perikarya, directly indicate the intensified response of the autonomic nervous system to inflammation and may indicate the disrupted variety of cholinergic and non-cholinergic mechanisms. An upregulation of populations expressing VIP and other neuronal factors confirms the properties of these substances. Best recognized for its anti-inflammatory functions, VIP plays a role in the regulation of contractility and enhances neuronal survivability in cells under pathological conditions, such as inflammations [53–57], whereas SOM changes motility and endometrial cell proliferation [58]. Moreover, it has recently been discovered that SOM influences contractile activity in inflamed uteri by increasing amplitude and decreasing frequency [59]. Under optimal conditions, NO is also known for its neuroprotective properties in both central and enteric nervous systems [32,60,61]. Although studies on immature pigs' PCG have not found nitrergic perikarya [39], studies in rats and pigs indicate that the nitrergic nerve fibers supplying the uterine horn can derive from the mentioned ganglion [30,62]. The current results present a downregulation of cholinergic but upregulation of non-cholinergic, nNOS-immunoreactive neurons, which may be due to the increased importance of the nitrergic, sympathetic perikarya in a state of inflammation. This would be in line with the authors' previous study on the sympathetic component of the PCG, in which a noradrenergic, nNOS-positive population noted a statistically significant increase [30].

Interestingly, the presented studies show the appearance of a minor cholinergic, GAL-expressing population and the emergence of a small population of GAL-positive, non-cholinergic neuronal cells in the *E. coli* treated group. It is generally known and accepted that GAL shows neuroprotective functions during brain injury and neurodegenerative diseases [63]. Alternatively, GAL may modulate the activity of other neurotransmitter systems, which, in turn, influence cholinergic transmission. Moreover, GAL has been proven to stimulate uterine contractility [64,65] and change the amplitude and frequency of uterine contractions [66]. Thus far, cholinergic, GAL-expressing neurons have been shown to exist in brain formations such as the basal forebrain and the hippocampus [67]. Research carried out on uterine innervation in immature pigs has shown no GAL-expressing populations [3] but uptake in GAL expression in response to axotomy was described earlier [39,40]. Endometritis-evoked emergence of VAChT+/GAL+ and VAChT-/GAL+ populations may suggest an increasing demand to upregulate this valuable neurotransmitter in order to benefit from its favorable properties. However, the rise in the non-cholinergic population is more significant, implying the greater importance of the non-cholinergic response of PCG neurons.

Regarding the earlier mentioned results of other authors, it has been shown that various treatments, either traumatic or non-traumatic, have detectable effects on cholinergic populations. The current results mainly showed an upregulation of ACh-expressing uterine neurons in response to endometritis, thus pointing to increased demand for ACh. It has

been established that ACh exerts a vasodilatory effect in the uteri of guinea pigs and rats [68,69] and plays a role in increased contractility of the gilt uterus, supporting exudate removal [70,71]. Even though recent studies on the impact of Ach on contractility of the inflamed uterus confirmed its contraction-enhancing properties in groups without *E. coli* treatment, surprisingly, bacterial administration caused a decrease in the amplitude and an increase in the frequency of contractions by acting through muscarinic receptor 2 (MR2) and muscarinic receptor 3 (MR3). It may be speculated that this is due to changes in the expression of these receptors in response to inflammation, or it may result from the changes in their sensitivity [72,73]. It should be noted that the drop in contractility could also have resulted from the increased ACh effect and intensified production of myometrium relaxing substances, such as NO [72,74]. Moreover, parasympathetic nerve endings may be sources of NO in the inflamed uterus, as confirmed earlier in other inflamed organs [75]. In addition to having an effect on contractility, ACh influences the secretory activity of uteri in physiological conditions [76]. This fact may suggest that ACh plays a role in secretory mechanisms in the inflamed uteri as well.

It is worth mentioning that the number of neuronal populations expressing the examined neurotransmitters in cholinergic PCG perikarya is lower than in their noradrenergic equivalents. Moreover, the entire ACh-positive population is much lower in numbers than the population of the sympathetic counterparts [30]. Recent studies on the effect of partial hysterectomy on PCG neurons showed that, in immature pigs, cholinergic neurons supplying the right uterine horn were not present and did not appear after hysterectomy [40]. Since the results presented in this paper are the first to indicate the existence of such a type of perikarya in sexually mature gilts, it may be assumed that such populations appear after sexual maturation, albeit in small numbers. Additionally, the mentioned studies were performed on neurons innervating one of the horns, and data on how exactly this organ's right and left part innervation is divided in PCG neurons are lacking [40]. It is known that the uterus exhibits physiological changes in response to the altered levels of sex hormones [19]. Such alterations, including estrogen levels during gilt' maturation, may play a role in the differentiation of a minor number of neurons, possibly from a non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) population [77], into a cholinergic phenotype, since it was proven that long-term E2 administration has an impact on chemical coding of ovarian perikarya in PCG [37]. Additionally, in rats, estrogen supplementation resulted in an increase in the diameter and density of the cholinergic nerve fibers in the uterus when applied during the infantile period [17].

Furthermore, the neuronal response to the bacterial administration of the cholinergic, neurotransmitter-positive uterine perikarya was less pronounced as a percentage, when compared with the dopamine beta-hydroxylase (DβH)-expressing population, as presented in a recent study by the authors [30]. However, the numbers of acetylcholine-positive, neurotransmitter-negative neurons showed a more marked increase, again implying a rising demand for ACh. In summary, such a situation may confirm that the sympathetic component of the PCG is more dominant in terms of uterine-horn innervation and it potentially plays a more pivotal role in the neurochemical expression of the described substances to pathological states, as shown in various different studies [29,30,40].

5. Conclusions

Intrauterine bacterial administration changes the neurochemical pattern organization of the cholinergic, uterus-innervating perikarya in the PCG, as demonstrated above. VAChT, SOM, nNOS, GAL, and VIP noted alterations in their expression, including AChE, emphasizing the significant adaptation capabilities of the uterus and the neurons supplying it. Additionally, the current results affirm the usability of pig models in studies on the effects of pathological states. The aim of science is to obtain novel data for further practical use and implementation. The collected results may find such an application and lead to the enhancement of reproductive indicators, increased profitability of animal production, and lower index of elimination from breeding by more efficient treatment of endometritis.

Author Contributions: Conceptualization, B.J. and B.M.; methodology, B.J.; formal analysis, B.M.; investigation, B.M. and B.J.; resources, B.J. and J.C.; data curation, B.M.; writing—original draft preparation, B.M.; writing—review and editing, B.J. and J.C.; visualization, B.M.; supervision, B.J. and J.C.; project administration, B.J.; funding acquisition, B.J. and J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Center, Poland (grant No. 2014/15/B/NZ5/O3572). Project financially supported by the Minister of Education and Science under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN, which will cover the publication charges.

Institutional Review Board Statement: Procedures were carried out respecting the relevant Polish and EU legislation concerning Animal Protection and Welfare (Leg. Decree 26/2014 implementing the EU directive 2010/63/EU). The procedures were approved and permission for specimen collection was granted by the Local Ethics Committee of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Consent no. 65/2015), affiliated with the National Ethics Commission for animal experimentation (Polish Ministry of Science and Higher Education).

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Acknowledgments: We thank Andrzej Pobiedziński and Joanna Kalinowska for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Keast, J.R. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* **1995**, *66*, 655–662. [CrossRef]
2. Keast, J.R. The autonomic nerve supply of male sex organs—An important target of circulating androgens. *Behav. Brain Res.* **1999**, *105*, 81–92. [CrossRef]
3. Wasowicz, K.; Podlasz, P.; Czaja, K.; Łakomy, M. Uterus-innervating neurones of paracervical ganglion in the pig: Immunohistochemical characteristics. *Folia Morphol.* **2002**, *61*, 15–20.
4. Keast, J.R.; Luckensmeyer, G.B.; Schemann, M. All pelvic neurons in male rats contain immunoreactivity for the synthetic enzymes of either noradrenaline or acetylcholine. *Neurosci. Lett.* **1995**, *196*, 209–212. [CrossRef]
5. Majewski, M. Afferent and efferent innervation of the porcine ovary-sourcesof origin and chemical coding. *Acta Acad. Agric. Techcol. Olst. Vet. Suppl.* **1997**, *B24*, 3–125. (In Polish)
6. Bell, C. Dual vasoconstrictor and vasodilator innervation of the uterine arterial supply in the guinea-pig. *Circ. Res.* **1968**, *23*, 279–289. [CrossRef]
7. Wasowicz, K.; Majewski, M.; Lakomy, M. Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1998**, *74*, 13–22. [CrossRef]
8. De Winter, P.J.J.; Verdonck, M.; De Kruif, A.; Devriese, L.A.; Haesebrouck, R. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: Prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. *Anim. Reprod. Sci.* **1995**, *37*, 325–335. [CrossRef]
9. Robertson, J.; Moll, D.; Saunders, G. Chronic Staphylococcus aureus endometritis in a virgin gilt. *Vet. Rec.* **2007**, *161*, 821–822.
10. Tummaruk, P.; Kesdangsakonwut, S.; Prapasarakul, N.; Kaeoket, K. Endometritis in gilts: Reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. *Comp. Clin. Pathol.* **2010**, *19*, 575–584. [CrossRef]
11. Karnovsky, M.J.; Roots, L.A. "Direct-coloring" thicholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **1964**, *12*, 219–221. [CrossRef] [PubMed]
12. Silver, A. *The Biology of Cholinesterases*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1974.
13. Fischer, M.; Ittah, A.; Liefer, I.; Gorecki, M. Expression and reconstruction of biologically active human acetylcholinesterase from Escherichia coli. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1993**, *13*, 25–38. [CrossRef] [PubMed]
14. Garfield, R.E. Structural studies of innervation on nonpregnant rat uterus. *Am. J. Physiol.* **1986**, *251*, C41–C54. [CrossRef] [PubMed]
15. Haase, G.; Kennel, P.; Pettmann, B.; Vigne, E.; Akli, S.; Revah, F.; Schmalbruch, H.; Kahn, A. Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 429–436. [CrossRef]
16. Papka, R.E.; Traurig, H.H.; Schemann, M.; Collins, J.; Copelin, T.; Wilson, K. Cholinergic neurons of the pelvic autonomic ganglia and uterus of the female rat: Distribution of axons and presence of muscarinic receptors. *Cell Tissue Res.* **1999**, *296*, 293–305. [CrossRef]
17. Richeri, A.; Viettro, L.; Chavez-Genaro, R.; Burnstock, G.; Cowen, T.; Monica Brauer, M. Effects of infantile/prepubertal chronic estrogen treatment and chemical sympathectomy with guanethidine on developing cholinergic nerves of the rat uterus. *J. Histochem. Cytochem.* **2002**, *50*, 839–850. [CrossRef]

18. Mitchell, B.S. Morphology and neurochemistry of the pelvic and paracervical ganglia. *Histol. Histopathol.* **1993**, *8*, 761–773.
19. Alm, P.; Aluments, J.; Hakanson, R.; Helm, G.; Owman, C.; Sjöberg, N.O.; Sundler, F. Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1980**, *136*, 349–351. [CrossRef]
20. Schultzberg, M.; Hökfelt, T.; Lundberg, J.M.; Daalsgard, C.J.; Elfvin, L.G. Transmitter histochemistry of autonomic ganglia. In *Autonomic Ganglia*; Elfvin, L.-G., Ed.; Chichester: Wiley, UK, 1983; pp. 205–233.
21. Gu, J.; Polak, J.M.; Su, H.C.; Blank, M.A.; Morrison, J.F.B.; Bloom, S.R. Demonstration of paracervical ganglion origin for the vasoactive intestinal polypeptide containing nerves of the rat uterus using retrograde tracing techniques combined with immunocytochemistry and denervation procedures. *Neurosci. Lett.* **1984**, *51*, 377–382. [CrossRef]
22. Inyama, C.O.; Hacker, G.W.; Gu, J.; Dahl, D.; Bloom, S.R.; Polak, J.M. Cytochemical relationships in the paracervical ganglion (Frankenhauser) of rat studied by immunocytochemistry. *Neurosci. Lett.* **1985**, *55*, 311–316. [CrossRef]
23. Podlasz, P.; Wasowicz, K. Neurochemical characteristics of paracervical ganglion in the pig. *Vet. Med.* **2008**, *53*, 135–146. [CrossRef]
24. Burliński, P.J.; Gonkowski, S.; Całka, J. Tetrodotoxin- and resiniferatoxin-induced changes in paracervical ganglion ChAT- and nNOS-IR neurons supplying the urinary bladder in female pigs. *Acta Vet. Hung.* **2011**, *59*, 455–463. [CrossRef] [PubMed]
25. Wesselmann, U.; Czakanski, P.P.; Affaitati, G.; Giamberardino, M.A. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: Behavioral characterization in the rat. *Neurosci. Lett.* **1998**, *246*, 73–76. [CrossRef]
26. Li, J.; Micevych, P.; McDonald, J.; Rapkin, A.; Chaban, V. Inflammation in the uterus induces phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and substance P immunoreactivity in dorsal root ganglia neurons innervating both uterus and colon in rats. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 2746–2752. [CrossRef]
27. Meller, K.; Całka, J.; Palus, K.; Jana, B. Inflammation-induced changes in expression of DβH, SP and GAL in the porcine uterine nerve fibres. In Proceedings of the 4th Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction "Central and local Regulations of Reproductive Processes", Zakopane, Poland, 3–4 February 2016.
28. Bulc, M.; Całka, J.; Meller, K.; Jana, B. Endometritis affects chemical coding of the dorsal root ganglia neurons supplying uterus in the sexually mature gilts. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *124*, 417–425. [CrossRef]
29. Jana, B.; Całka, J. Endometritis changes the neurochemical characteristics of the caudal mesenteric ganglion neurons supplying the gilt uterus. *Animals* **2020**, *10*, 891. [CrossRef]
30. Miciński, B.; Jana, B.; Całka, J. Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 240. [CrossRef]
31. Verma, N.; Rettenmeier, A.W.; Schmitz-Spanke, S. Recent advances in the use of Sus scrofa (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics* **2011**, *11*, 776–793. [CrossRef]
32. Swindle, M.M.; Makin, A.; Herron, A.J.; Clubb, F.J., Jr.; Frazier, K.S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16612–16617. [CrossRef]
33. De Winter, P.J.J.; Verdonck, M.; De Kruif, A.; Coryn, M.; Deluyker, H.A.; Devriese, L.A.; Haesebrouck, F. The relationship between the blood progesterone concentration at early metoestrus and uterine infection in the sow. *Anim. Reprod. Sci.* **1996**, *41*, 51–59. [CrossRef]
34. Lewis, G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci.* **2004**, *82–83*, 281–294. [CrossRef] [PubMed]
35. De Winter, P.J.J.; Verdonck, M.; de Kruif, A.; Devriese, L.A.; Haesebrouck, F. Endometritis and vaginal discharge in the sow. *Anim. Reprod. Sci.* **1992**, *28*, 51–58. [CrossRef]
36. Jana, B.; Kucharski, J.; Dzienis, A.; Deptuła, K. Changes in prostaglandin production and ovarian function in gilts during endometritis induced by Escherichia coli infection. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *97*, 137–150. [CrossRef] [PubMed]
37. Jana, B.; Palus, K.; Czarzasta, J.; Całka, J. Long-term estradiol-17β administration changes population of paracervical ganglion neurons supplying the ovary in adult gilts. *J. Mol. Neurosci.* **2013**, *50*, 424–433. [CrossRef] [PubMed]
38. Jana, B.; Całka, J.; Bulc, M.; Czarzasta, J. Long-term testosterone administration affects the number of paracervical ganglion ovary-projecting neurons in sexually mature gilts. *Neurosci. Res.* **2014**, *83*, 89–96. [CrossRef] [PubMed]
39. Listowska, Ż.; Pidsudko, Z. Changes in the neurochemical coding of the anterior pelvic ganglion neurons supplying the male pig urinary bladder trigone after one-sided axotomy of their nerve fibers. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2231. [CrossRef]
40. Podlasz, P.; Wąsowicz, K. Effect of partial hysterectomy on the neurons of the paracervical ganglion (PCG) of the pig. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0245974.
41. Rytel, L.; Gonkowski, S. The influence of bisphenol a on the nitrergic nervous structures in the domestic porcine uterus. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4543. [CrossRef]
42. Łakomy, M.; Kaleczyc, J.; Całka, J. The effect of oestradiolum benzoicum and progesterone on AChE activity in the nerves of the female reproductive system of immature pigs. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* **1986**, *132*, 333–348.
43. Rienda, B.; Elexpe, A.; Tolentino-Cortez, T.; Gulak, M.; Bruzos-Cidon, C.; Torrecilla, M.; Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G. Analysis of acetylcholinesterase activity in cell membrane microarrays of brain areas as a screening tool to identify tissue specific inhibitors. *Analytica* **2021**, *2*, 25–36. [CrossRef]
44. Łakomy, M.; Doboszyńska, T.; Dynarowicz, I.; Kotwica, J.; Zasadowski, A. Changes of AChE activity in ovarian nerves of pigs in different periods of the oestrous cycle: Relationship to ovarian steroids. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* **1984**, *130*, 719–731. [PubMed]
45. Jana, B.; Kucharski, J.; Ziecik, A. Effect of intrauterine infusion of Escherichia coli on hormonal patterns in gilts during the oestrous cycle. *Reprod. Nutr. Dev.* **2004**, *44*, 37–48. [CrossRef] [PubMed]

46. Hughes, J.P.; Stabenfeldt, G.H.; Kindahl, H.; Kennedy, P.C.; Edqvist, L.E.; Neely, D.P.; Schalm, O.W. Pyometra in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1979**, *27*, 321–329.
47. Owman, C.; Alm, P.; Bjorklund, A.; Thorbert, G. Extensive sympathetic denervation of the uterus during pregnancy as evidenced by tyrosine hydroxylase determinations in the guinea pig. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1980**, *25*, 313–320.
48. Alm, P.; Owman, C.; Sjoberg, N.O.; Stjernquist, M.; Sundler, F. Histochemical demonstration of a concomitant reduction in neural vasoactive intestinal polypeptide, acetylcholinesterase, and noradrenaline of cat uterus during pregnancy. *Neuroscience* **1986**, *18*, 713–726. [CrossRef]
49. Alm, P.; Lundberg, L.M.; Wharton, J.; Polak, J.M. Effects of pregnancy on the extrinsic innervation of the guinea pig uterus. A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochem. J.* **1988**, *20*, 414–426. [CrossRef]
50. Alm, P.; Lundberg, L.M.; Wharton, J.; Polak, J.M. Organization of the guinea-pig uterine innervation. Distribution of immunoreactivities for different neuronal markers. Effects of chemical- and pregnancy-induced sympathectomy. *Histochem. J.* **1988**, *20*, 290–300. [CrossRef]
51. Zoubina, E.V.; Fan, Q.; Smith, P.G. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *397*, 561–571. [CrossRef]
52. Zoubina, E.V.; Smith, P.G. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton. Neurosci. Basic. Clin.* **2000**, *84*, 176–185. [CrossRef]
53. Bryman, I.; Norström, A.; Lindblom, B.; Dahlström, A. Histochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide and its influence on contractile activity in the non-pregnant and pregnant human cervix. *Gynecol. Obstet. Investig.* **1989**, *28*, 57–61. [CrossRef]
54. Delgado, M.; Ganea, D. Cutting edge: Is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2907–2912. [CrossRef]
55. Delgado, M.; Abad, C.; Martinez, C.; Juarranz, M.G.; Arranz, A.; Gomariz, R.P.; Leceta, J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: Potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J. Mol. Med.* **2002**, *80*, 16–24. [CrossRef]
56. Abad, C.; Martinez Juarranz, M.G.; Arranz, A.; Leceta, J.; Delgado, M.; Gomariz, R. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 961–971. [CrossRef]
57. Palus, K.; Całka, J.; Jana, B. Alterations in the relative abundance of the vasoactive intestinal peptide receptors (VPAC1 and VPAC2) and functions in uterine contractility during inflammation. *Anim. Reprod. Sci.* **2021**, *225*, 106680. [CrossRef]
58. Annunziata, M.; Luque, R.M.; Durán-Prado, M.; Baragli, A.; Grande, C.; Volante, M.; Gahete, M.D.; Deltetto, F.; Camanni, M.; Ghigo, E.; et al. Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 2117–2129. [CrossRef]
59. Jana, B.; Całka, J.; Czajkowska, M. The role of somatostatin and its receptors (sstr2, sstr5) in the contractility of gilt inflamed uterus. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *133*, 163–173. [CrossRef]
60. Calabrese, V.; Mancuso, C.; Calvani, M.; Rizzarelli, E.; Butterfield, A.D.; Giuffrida Stella, A.M. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 766–775. [CrossRef]
61. Rytel, L.; Całka, J. Neuropeptide profile changes in sensory neurones after partial prepyloric resection in pigs. *Ann. Anat.* **2016**, *206*, 48–56. [CrossRef]
62. Papka, R.E.; McNeill, D.L.; Thompson, D.; Schmidt, H.H.H.W. Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides. *Cell Tissue Res.* **1995**, *279*, 339–349. [CrossRef]
63. Weyne, E.; Albersen, M.; Hannan, J.L.; Castiglione, F.; Hedlund, P.; Verbist, G.; De Ridder, D.; Bivalacqua, T.J.; Van der Aa, F. Increased expression of the neuroregenerative peptide galanin in the major pelvic ganglion following cavernous nerve injury. *J. Sex. Med.* **2014**, *11*, 1685–1693. [CrossRef]
64. Niiro, N.; Nishimura, J.; Hirano, K.; Nakano, H.; Kanaide, H. Mechanisms of galanin-induced contraction in the rat myome-trium. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 1623–1632. [CrossRef] [PubMed]
65. Shew, R.; Papka, R.; McNeill, D. Galanin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in nerves of the rat uterus: Localization, colocalization, and effects on uterine contractility. *Peptides* **1992**, *13*, 273–279. [CrossRef]
66. Jana, B.; Całka, J.; Miciński, B. Regulatory influence of galanin and GALR/GALR2 receptors on inflamed uterus contractility in pigs. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6415. [CrossRef]
67. Miller, M.A.; Kolb, P.E.; Raskind, M.A. GALR1 galanin receptor mRNA is co-expessed by galanin neurons but not cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **1997**, *52*, 121–129. [CrossRef]
68. Jovanović, A.; Jovanović, S.; Urbović, L. Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine in pregnant guinea-pig uterine artery. *Hum. Reprod.* **1997**, *12*, 1805–1809. [CrossRef] [PubMed]
69. Lamireau, D.; Nuyt, A.M.; Hou, X.; Bernier, S.; Beauchamp, M.; Gobeil, F.; Lahaie, I.; Varma, D.R.; Chemtob, S. Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke* **2002**, *33*, 2992–2998. [CrossRef] [PubMed]
70. Jana, B.; Jaroszewski, J.; Kucharski, J.; Koszykowska, M.; Górska, J.; Markiewicz, W. Participation of prostaglandin E2 in contractile activity of inflamed porcine uterus. *Acta Vet. Brno* **2010**, *79*, 249–259. [CrossRef]
71. Jana, B.; Jaroszewski, J.; Czarzasta, J.; Włodarczyk, M.; Markiewicz, W. Synthesis of prostacyclin and its effect on the contractile activity of the inflamed porcine uterus. *Theriogenology* **2013**, *79*, 470–485. [CrossRef]
72. Jana, B.; Całka, J.; Bulc, M.; Piotrowska-Tomala, K.K. Participation of acetylcholine and its receptors in the contractility of inflamed porcine uterus. *Theriogenology* **2019**, *143*, 123–132. [CrossRef]

73. Jana, B.; Całka, J.; Palus, K.; Sikora, M. Escherichia coli-induced inflammation changes the expression of acetylcholine receptors (M2R, M3R and α-7 nAChR) in the pig uterus. *J. Vet. Res.* **2020**, *64*, 531–541. [CrossRef]
74. Español, A.J.; Maddaleno, M.O.; Lombardi, M.G.; Cella, M.; Martínez Pulido, P.; Sales, M.E. Treatment with LPS plus INF-γ induces the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors, modulating NIH3T3 cell proliferation: Participation of NOS and COX. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 5154–5167. [CrossRef] [PubMed]
75. Gańko, M.; Całka, J. Prolonged acetylsalicylic-acid-supplementation-induced gastritis affects the chemical coding of the stomach innervating vagal efferent neurons in the porcinedorsal motor vagal nucleus (DMX). *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 188–198. [CrossRef] [PubMed]
76. Paris, J.; Williams, K.J.; Hermsmeyer, K.R.; Delansorne, R. Nomegestrol acetate and vascular reactivity: Nonhuman primate experiments. *Steroids* **2000**, *65*, 621–627. [CrossRef]
77. Pan, J.; Rhode, H.K.; Undem, B.J.; Myers, A.C. Neurotransmitters in airway parasympathetic neurons altered by neurotrophin-3 and repeated allergen challenge. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2010**, *43*, 452–457. [CrossRef] [PubMed]