UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ LEKARSKI

WYDZIAŁ: LEKARSKI

Dziedzina: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Dyscyplina: nauki medyczne

Urszula Mazur

Rozprawa doktorska

Charakterystyka komórek nerwowych zawierających feniksynę-14 w zwojach czuciowych korzeni grzbietowych (DRG) u świni, jako zwierzęcia modelowego, ze szczególnym uwzględnieniem neuronów zaopatrujących szyjkę macicy.

Characterization of phoenixin-14-containing nerve cells in dorsal root ganglia (DRG) of the pig as an animal model, with particular emphasis on neurons supplying the uterine cervix.

Praca wykonana w Katedrze Fizjologii i Patofizjologii Człowieka

Promotor: **dr hab. n. med. Agnieszka Bossowska, prof. UWM, Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka**

Olsztyn, rok 2026

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Urszula Mazur**, Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska. Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons. Int J Mol Sci. 2023 Nov 23;24(23):16647. doi:10.3390/ijms242316647.
   IF = 4.9 Punkty MNiSW = 140

2. **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska. Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix. Cells 2025 Mar 31;14(7):516. doi: 10.3390/cells14070516.
   IF = 5.2 Punkty MNiSW = 140

Oryginalne prace zamieszczone są na końcu rozprawy.

Spis treści

Streszczenie ... 8
Abstract ... 9
1. Wstęp ... 10
1.1. Odkrycie feniksyny (PNX) oraz miejsca jej ekspresji ... 10
1.2. Receptor PNX ... 11
1.3. Funkcje PNX ... 12
1.3.1. Wpływ PNX na funkcje rozrodcze ... 12
1.3.2. Wpływ PNX na zachowanie ... 13
1.3.3. Wpływ PNX na procesy poznawcze i zapamiętywanie ... 14
1.3.4. Wpływ PNX na układ sercowo-naczyniowy ... 15
1.3.5. Wpływ PNX na regulację pobierania pokarmu ... 16
1.3.6. Wpływ PNX na procesy związane z nocycepcją ... 17
1.4. Budowa zwojów DRG ... 18
1.5. Neuroprzekaźniki ... 20
1.5.1. CGRP ... 20
1.5.2. SP ... 21
1.5.3. nNOS ... 23
1.5.4. GAL ... 24
1.5.5. CRT ... 25
1.5.6. PACAP ... 26
1.5.7. CART ... 26
1.5.8. SOM ... 27
2. Cele ... 29
3. Materiał i metody ... 31
3.1. Zwierzęta doświadczalne ... 31
3.2. Zabiegi chirurgiczne ... 31
3.2.1. Pobranie DRG w celu analizy ogólnej obecności PNX w ich neuronach ... 31
3.2.2. Pozyskanie DRG do oceny ekspresji PNX w neuronach unerwiających szyjkę macicy ... 31
3.3. Spektrometria mas (MS) ... 32
3.4. Barwienia immunofluorescencyjne (IF) ... 32
3.4.1. Obróbka materiału do barwień IF ... 32
4.Wyniki ... 36
4.1. Neurony FB^+ unerwiające szyjkę macicy ... 36

4.2. Występowanie neuronów PNX^+ w zwojach DRG 37
4.3. Analiza morfometryczna komórek PNX^+ 38
4.4. Rozmieszczenie komórek PNX^+ w zwojach DRG 39
4.5. Charakterystyka neurochemiczna neuronów PNX^+ 40
4.5.1. Kolokalizacja PNX i CGRP 40
4.5.2. Kolokalizacja PNX i SP 45
4.5.3. Kolokalizacja PNX i nNOS 46
4.5.4. Kolokalizacja PNX i GAL 47
4.5.5. Kolokalizacja PNX i CRT 48
4.5.6. Kolokalizacja PNX i PACAP 48
4.5.7. Kolokalizacja PNX i CART 49
4.5.8. Kolokalizacja PNX i SOM 50
4.5.9. Wzorzec wielokrotnej kolokalizacji PNX z substancjami biologicznie czynnymi w neuronach czuciowych unerwiających szyjkę macicy 51
5. Podsumowanie i wnioski 53
6. Literatura 55
7. Spis rycin oraz tabel 77

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

AD	choroba Alzheimera
ARC	jądro łukowate
ASIC	kanały jonowe wrażliwe na zakwaszenie
BNST	jądro łożyskowe prążka krańcowego
C	odcinek szyjny rdzenia kręgowego
C1, C4, C7	odpowiednio pierwszy, czwarty, siódmy neuromer odcinka szyjnego
cAMP/PKA	szlak cyklicznego adenozynomonofosforanu i kinazy białkowej A
CART	transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą
Cd	domena doogonowa zwoju czuciowego
CGRP	peptyd zależny od genu kalcytoniny
α-CGRP	izoforma alfa peptydu zależnego od genu kalcytoniny
β-CGRP	izoforma beta peptydu zależnego od genu kalcytoniny
CUN	centralny układ nerwowy
Cr	domena doczaszkowa zwoju
CRT	kalretynina
CREB	białko wiążące element cAMP
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy
CY3	Cyjanina-3
Cq	odcinek ogonowy rdzenia kręgowego
DMNV	jądro motoryczne grzbietowe nerwu błędnego
DRG	zwój korzenia grzbietowego
ELISA	test immunoenzymatyczny
ERK1/2	kinaza regulowana sygnalizacją zewnątrzkomórkową
FB	znacznik neuronalny Fast Blue

FITC	izotiocyjanian fluoresceiny
FSH	folikulotropina
GAL	galanina
GnRH	hormon uwalniający gonadotropiny
gp	świnka morska
GPR173	receptor sprzężony z białkiem G 173
HGrC1	komórki ziarniste jajnika
HPG	oś podwzgórze-przysadka-gonady
i.c.v	iniekcja dokomorowa
IF	barwienia immunofluorescencyjne
IgG	immunoglobulina G
Kiss	kisspeptyna
L	odcinek lędźwiowy rdzenia kręgowego
L1 - L6	zwoje korzeni grzbietowych segmentów lędźwiowych rdzenia kręgowego
LC-MS	układu chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas
ox-LDL	ox-LDL-utleniony cholesterol
LH	lutropina
LPS	lipopolisacharyd
m.c	masa ciała
MCI	łagodne upośledzenia funkcji poznawczych
Md	domena środkowa zwoju
MeA	jądro środkowe ciała migdałowatego
mo	mysz
MS	spektroskopia mas
NGF	czynnik wzrostu neuronów

NK1	receptor neurokininy typu 1
NO	tlenek azotu
eNOS	śródbłonkowa izoforma syntazy tlenku azotu
nNOS	neuronalna izoforma syntazy tlenku azotu
NTS	jądro pasma samotnego
OUN	obwodowy układ nerwowy
P	domena obwodowa zwoju
PAC1	receptor PACAP
PACAP	polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami
PCOS	zespół policystycznych jajników
PGP 9.5	produkt genu białkowego 9.5
PKB	kinaza białkowa B
PNX	feniksyna-14
PNX^+	feniksyno–pozytywne (odpowiednio komórki lub włókna nerwowe)
PNX-20	feniksyna-20
PSM	dopasowywanie widma masowego do sekwencji peptydu
PVA	paraformaldehyd
PVN	jądro przykomorowe
rb	królik
RISK	szlak kinazy ratunkowej po uszkodzeniu reperfuzyjnym
rt	szczur
S	odcinek krzyżowy rdzenia kręgowego
S1 – S4	zwoje korzeni grzbietowych segmentów krzyżowych rdzenia kręgowego
SAFE	szlak wzmocnienia czynnika aktywującego przeżycie

SD	odchylenie standardowe
SEM	błąd standardowy średniej
siRNA	mały interferujący RNA
SMIM20	małe integralne białko błonowe 20
SOM	somatostatyna
SON	jądro nadwzrokowe
SP	substancja P
SREB	super konserwatywna grupa receptorów w mózgu
TG	zwój trójdzielny
Th	odcinek piersiowy rdzenia kręgowego
Th1 - Th15	zwoje korzeni grzbietowych segmentów piersiowych rdzenia kręgowego
VIP	wazoaktywny peptyd jelitowy
VMH	podwzgórze brzuszno-przyśrodkowe

Streszczenie

Feniksyna (PNX), neuropeptyd początkowo zidentyfikowany w podwzgórzu szczura, odgrywa istotną rolę zarówno w układzie rozrodczym – gdzie stymuluje uwalnianie hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH) – jak i w układzie nerwowym, gdzie PNX wykryto m.in. w neuronach zwojów czuciowych korzeni grzbietowych (DRG), co sugeruje jej rolę w modulacji bólu i/lub świądu.

Obecnie brakuje danych zarówno na temat rozmieszczenia PNX w neuronach zwojów DRG, jak i jej udziału w unerwieniu czuciowym szyjki macicy, co utrudnia pełne zrozumienie mechanizmów percepcji czuciowej w tym obszarze. W niniejszym badaniu zbadano: 1) wzór(y) występowania oraz wewnątrzzwojowe rozmieszczenie PNX w neuronach wybranych zwojów DRG poszczególnych segmentów rdzenia kręgowego świni, oraz w populacji neuronów zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy 2) wzór(-y) współwystępowania PNX z innymi substancjami biologicznie czynnymi w neuronach zwojów DRG.

Obecność PNX wykazano w około 20% wszystkich neuronów zwojów DRG poziomów: szyjnego (C), piersiowego (Th), lędźwiowego (L) oraz krzyżowego (S) rdzenia kręgowego. Największą populacją komórek PNX-pozytywnych (PNX^+) były neurony małe (ok. 74%). Neurony PNX^+ zawierały peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP; 96,1%), substancję P (SP; 88,5%), syntazę tlenku azotu (nNOS; 52,1%), galaninę (GAL; 20,7%), kalretyninę (CRT; 10%), polipeptyd aktywujący cyklazę adenylanową przysadki mózgowej (PACAP; 7,4%), transkrypt powiązany z kokainą i amfetaminą (CART; 5,1%) i/lub somatostatynę (SOM; 4,7%).

Około 33% neuronów PNX^+ zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy obserwowano w zwojach DRG poziomów: L (73,4%) oraz S (26,6%) rdzenia kręgowego. PNX obecna była zarówno w komórkach małych, średnich, jak i dużych (52%, 40,5%, 7,5%) i współwystępowała z CGRP (80,9%), SP (77,9%), nNOS (34%), PACAP (21,4%), GAL (7,4%), CRT (3,1%) i SOM (0,7%).

Chociaż dokładna funkcja PNX w DRG nie jest jeszcze znana, wysoki stopień kolokalizacji tego peptydu z głównymi przekaźnikami nocyceptywnymi SP i CGRP może sugerować jego funkcję w modulowaniu przenoszenia bólu.

Słowa kluczowe: Feniksyna, zwój korzenia grzbietowego, neurotransmitery, szyjka macicy, immunofluorescencja

Abstract

Phoenixin (PNX), a neuropeptide initially identified in the rat hypothalamus, plays a crucial role in both the reproductive system—where it stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)—and the nervous system, where PNX has been detected, among others, in neurons of the dorsal root ganglia (DRG), suggesting a role in the modulation of pain and/or itch.

Currently, data on both the distribution of PNX in DRG neurons and its involvement in uterine cervix sensory innervation are lacking, hindering a full understanding of the mechanisms of sensory perception in this region. This study examined: 1) the pattern(s) of PNX occurrence and intraganglionic distribution in neurons of selected DRG ganglia of individual porcine spinal cord segments, as well as in the population of neurons supplying sensory sensation to the uterine cervix; and 2) the pattern(s) of PNX co-occurrence with other biologically active substances in DRG neurons.

The presence of PNX was demonstrated in approximately 20% of all DRG neurons at the cervical (C), thoracic (Th), lumbar (L), and sacral (S) levels of the spinal cord. The largest population of PNX-positive (PNX^+) cells was found in small neurons (approximately 74%). PNX^+ neurons contained calcitonin gene-related peptide (CGRP; 96.1%), substance P (SP; 88.5%), nitric oxide synthase (nNOS; 52.1%), galanin (GAL; 20.7%), calretinin (CRT; 10%), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 7.4%), cocaine- and amphetamine-related transcript (CART; 5.1%), and/or somatostatin (SOM; 4.7%).

Approximately 33% of PNX^+ neurons supplying sensory input to the uterine cervix were observed in the DRGs of the L (73.4%), and S (26.6%) levels of the spinal cord. PNX was present in both small, medium, and large cells (52%, 40.5%, and 7.5%) and co-expressed with CGRP (80.9%), SP (77.9%), nNOS (34%), PACAP (21.4%), GAL (7.4%), CRT (3.1%), and SOM (0.7%).

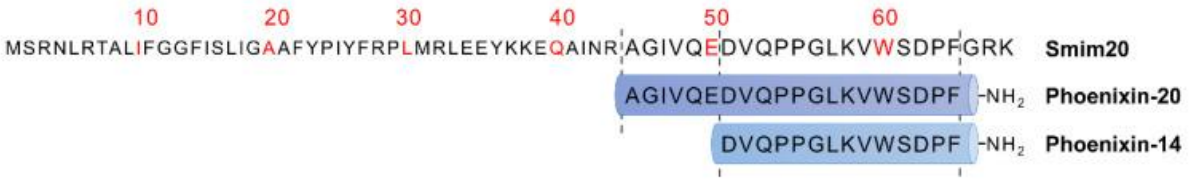
Although the exact function of PNX in the DRG is not yet known, the high degree of colocalization of this peptide with the primary nociceptive transmitters SP and CGRP may suggest its role in modulating pain transmission.

Keywords: Phoenixin, dorsal root ganglion, neurotransmitters, uterine cervix, immunofluorescence

1. Wstęp

1.1. Odkrycie feniksyny (PNX) oraz miejsca jej ekspresji

Feniksyna-14 (ang. *phoenixin*, PNX; zidentyfikowana przy wykorzystaniu algorytmu bioinformatycznego), po raz pierwszy została wyizolowana z mózgu szczura w 2013 roku (Yosten i in., 2013). Podczas identyfikacji PNX wyróżniono kilka izoform tego neuropeptydu, przy czym cząsteczki 14- i 20-aminokwasowe występowały najliczniej. PNX to amidowany neuropeptyd, składający się z sekwencji DVQPPGLKVWSDPF (**Rycina 1**), posiadający C-końcowy cztero-aminokwasowy fragment, niezbędny dla jej aktywności biologicznej.



Rycina 1. Sekwencja aminokwasowa peptydu prekursorowego feniksyny – Smim20 i jej dwóch głównych izoform: feniksyny-20 i feniksyny-14 (PNX). Źródło: Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–15. https://doi.org/10.3390/IJMS21218378.

Dzięki projektowi Human Genome wykazano, że u człowieka sekwencja nukleotydowa kodująca PNX zlokalizowana jest na chromosomie 4 p15.2 (Schalla i Stengel, 2018). PNX jest najobficiej występującym produktem rozszczepiania małego integralnego białka błonowego 20 (SMIM20) (Yosten i in., 2013), który zawiera resztę glicyny mogącej ulec C-końcowej amidacji, oraz kilka reszt dwuzasadowych po glicynie, co wskazuje na potencjalne miejsca cięcia karboksypeptydazy (Fricker, 2012; Lyu i in., 2013).

PNX o identycznej sekwencji występuje u wielu gatunków ssaków, w tym, między innymi, u człowieka, szczura, myszy, świni czy psa (Yosten i in., 2013), oraz o podobnej sekwencji u gatunków innych, niż ssaki tj. u ryb (scat plamisty, fugu; Wang i in., 2018), płazów (rodzaj Xenopus), czy ptaków (drób; Rajaei i in., 2022; Yosten i in., 2013). Występowanie mRNA dla PNX wykryto w różnych strukturach mózgowia, głównie w podwzgórzu (jądro przykomorowe -PVN, jądro nadwzrokowe -SON, jądro łukowate -ARC), kresomózgowiu (jądro łożyskowe prążka krańcowego -BNST), ciele migdałowatym (jądro centralne -MeA), śródmózgowiu (część siateczkowata istoty czarnej, jądro Edingera-Westphala), czy w rdzeniu przedłużonym (jądro pasma samotnego -NTS, jądro grzbietowe nerwu błędnego -DMNV) (Prinz i in., 2017; Yosten i in., 2013). Dodatkowo

immunoreaktywność dla PNX wykazano w powierzchniowej warstwie rogu grzbietowego rdzenia kręgowego u świni (Lepiarczyk i in., 2020), myszy i szczura, w rdzeniowym odcinku nerwu trójdzielnego, zwojach korzeni grzbietowych (DRG) oraz komórkach zwoju trójdzielnego (TG) u gryzoni (Lyu i in., 2013). W rogach grzbietowych rdzenia kręgowego świni PNX obecna była we włóknach nerwowych tworzących gęsty splot głównie w I i II blaszce Rexeda (Lepiarczyk i in., 2020). Oprócz centralnego układu nerwowego (CUN) oraz obwodowego układu nerwowego (OUN), obecność PNX wykryto również w różnych tkankach obwodowych, w tym w sercu, grasicy, przełyku, żołądku, jelitach, śledzionie, trzustce, nadnerczach, jajnikach, macicy i nerkach (Prinz i in., 2017; Yosten i in., 2013).

1.2. Receptor PNX

PNX jest znanym potencjalnym ligandem dla metabotropowego receptora sprzężonego z białkiem G (GPR173). GPR173 należy do super konserwatywnej grupy receptorów (SREB), do której zaliczamy: GPR27 (SREB1), GPR85 (SREB2) oraz GPR173 (określany jako SREB3). Pierwotnie ustalono, że SREB3 ulega największej ekspresji w mózgu i gonadach. W mózgowiu mRNA receptora GRP173 wykazano w jądrze migdałowatym, ARC, SON, brzuszno-przyśrodkowej części podwzgórza, PVN (Billert i in., 2020) oraz w neuronach zawierających gonadoliberynę (GnRH) i kisspeptynę (Kiss) (Nguyen i in., 2019). Z kolei w układzie rozrodczym obecność receptora GPR173 dla PNX potwierdzono w pęcherzykach jajnikowych (Billert i in., 2020) oraz w komórkach warstwy ziarnistej jajnika (Nguyen i in., 2019).

Za pomocą receptora GRP173, PNX powoduje między innymi wzmocnienie wydzielania lutropiny (LH), hormonu indukowanego przez GnRH (Stein i in., 2016), czy też zmniejszenie cytotoksyczności indukowanej lipopolisacharydem (LPS) (Sun i in., 2020). Wykazano także, że u kobiet z endometriozą, obniżony poziom PNX i obniżona ekspresja GPR173 może być odpowiedzialna za rozregulowanie osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG) (Kulinska i in., 2021). Spadek ekspresji składowych układu PNX/GPR173 zaobserwowano także w trakcie procesu zapalnego i powstawania zmian proliferacyjnych w endometrium suk dotkniętych torbielowatym rozrostem endometrium (Orentas i in., 2017; Rybska i in., 2022). Co więcej, efekty działania PNX wydają się zależeć nie tylko od działania peptydu na wspomniany receptor GPR173, ale również od stopnia ekspresji i aktywacji receptora GnRH. Udowodniono, że u myszy poprawę pamięci (Jiang i in., 2015) oraz działanie przeciwlękowe, indukowane przez iniekcje PNX do przednich obszarów

podwzgórza, można znieść podając antagonistę receptora GnRH (cetroreliks) (Jiang i in., 2015).

1.3. Funkcje PNX

1.3.1. Wpływ PNX na funkcje rozrodcze

Po raz pierwszy PNX została zidentyfikowana w podwzgórzu szczura i opisana jako peptyd biorący udział w procesach reprodukcyjnych poprzez wywieranie bezpośredniego wpływu na wzory wydzielania gonadotropin przysadki mózgowej (Stein i in., 2016). Oś HPG wytwarza neurohormony, które są niezbędne w regulowaniu procesów warunkujących dojrzałość płciową oraz odpowiadających za funkcje rozrodcze. Zgodnie z najnowszą literaturą, PNX odgrywa znaczącą rolę w aktywności osi HPG i może stymulować funkcje rozrodcze (Gołyszny i in., 2022) poprzez wzrost produkcji mRNA receptora dla GnRH, prowadząc w konsekwencji do zwiększonego uwalniania LH (Yosten i in., 2013). Inne dane pokazują, że hamowanie receptora GPR173 przez mały interferujący RNA (siRNA) zmniejszyło wpływ PNX na rozrodczość i zapobiegło, indukowanemu przez PNX, wydzielaniu LH u szczurów (Stein i in., 2016; Treen i in., 2016). Dodatkowo znaczne obniżenie ekspresji PNX w przysadce mózgowej szczurzyc opóźniało cykl rujowy o 2-3 dni (Yosten i in., 2013). Immunodetekcja PNX w neuronach wielkokomórkowych podwzgórza sugeruje, że peptyd ten, uwalniany do przysadki mózgowej, przyczynia się do komunikacji podwzgórzowo-przysadkowej, działając jako ogólny regulator wydzielania wewnętrznego (Stein i in., 2016). Z kolei lokalizacja PNX w komórkach jąder PVN i SON podwzgórza oraz w komórkach wyniosłości pośrodkowej, sugeruje wydzielanie tego peptydu do krążenia ogólnego, a zatem możliwość jego transportu do miejsc działania na obwodzie (Stein i in., 2016) takich jak jajnik (Kalamon i in., 2020), w tym pęcherzyki jajnikowe (Nguyen i in., 2019). Badania *in vitro* na ludzkim pęcherzyku jajnikowym wykazały, że PNX, poprzez aktywację receptora GPR173, nasila aktywność genów związanych z rozwojem pęcherzyków jajnikowych, promując ich wzrost poprzez przyspieszenie proliferacji komórek ziarnistych. PNX wzmaga także produkcję estradiolu w linii komórkowej ludzkich komórek ziarnistych jajnika (HGrC1) poprzez aktywację szlaku: cykliczny adenozynomonofosforan/kinaza białkowa A (cAMP/PKA) i stymulację fosforylacji białka wiążącego element odpowiedzi na cAMP (CREB) (Nguyen i in., 2019). Ponadto PNX znacznie zwiększa powierzchnię pęcherzyków, także w modelu hodowli tkanki jajnika mysiego, doprowadzając do zwiększenia liczby owulowanych oocytów (Nguyen i in., 2019). Udział PNX i GPR173

wykazano nie tylko w regulacji fazy folikularnej (Nguyen i in., 2019), ale również fazy lutealnej cyklu rujowego świni (Mlyczyńska i in., 2024). Okazało się, że PNX i jej receptor są obecne w ciałku żółtym świni, a ich poziomy zmieniają się podczas cyklu rujowego. PNX zwiększa wydzielanie progesteronu i estradiolu przez komórki lutealne, co wspomaga utrzymanie i funkcjonowanie ciałka żółtego (Mlyczyńska i in., 2024).

Istnieją także dowody na to, że wpływ PNX na wydzielanie hormonów rozrodczych wynika z jej interakcji z innymi peptydami zaangażowanymi w reprodukcję, takimi jak nesfatyna-1. Okazuje się, że nesfatyna-1 może nasilać wpływ PNX na uwalnianie hormonów rozrodczych, takich jak LH, folikulotropina (FSH) i testosteron, u samców szczurów (Guvenc i in., 2019). Obecność PNX i nesfatyny-1, oraz ich podwyższone poziomy, wykazano także we krwi kobiet cierpiących na zespół policystycznych jajników (PSMs), co koreluje z podwyższonym poziomem hormonów: LH i progesteronu (Ullah i in., 2017).

Z kolei u pacjentek z endometriozą obserwowano obniżone stężenie PNX w surowicy, co może być związane z patogenezą tej choroby, prowadząc do niekorzystnych zmian w obrębie endometrium (Kulinska i in., 2021). Wykazano także, że komórki endometrium w odpowiedzi na niski poziom PNX zwiększają syntezę jej prekursora SMIM20, co może sugerować potencjalną rolę PNX w poprawie dysfunkcji nabłonka (Kulinska i in., 2023) i stanowić skuteczną strategię stosowania PNX w leczeniu endometriozy.

1.3.2. Wpływ PNX na zachowanie

Badania prowadzone w 2015 roku na myszach wykazały przeciwlękowe działanie PNX (Jiang i in., 2015). Okazało się, że podanie PNX do komory bocznej, albo do przedniej części podwzgórza, redukowało zachowania lękowe u gryzoni w zastosowanych dwóch testach: otwartego pola i uniesionego labiryntu krzyżowego. Z kolei podanie selektywnego antagonisty receptora GnRH (cetroreliks) zniosło anksjolityczne działanie PNX. Wykazano także, że bezpośrednie podanie PNX do ciała migdałowatego, ośrodka odgrywającego kluczową rolę w zachowaniach lękowych oraz pamięci opartej na skojarzeniach emocjonalnych, nie wykazało żadnych efektów przeciwlękowych (Jiang i in., 2015). Dodatkowo, blokada receptorów dla oksytocyny/wazopresyny (hormonów odpowiedzialnych za regulację wzorców zachowania oraz stanów emocjonalnych) przez atosiban (antagonista receptorów oksytocyny i wazopresyny) nie zmieniła obserwowanego efektu przeciwlękowego. Na podstawie tych badań wysunięto hipotezę, że PNX generuje, niezależną od oksytocyny czy wazopresyny, aktywność przeciwlękową poprzez stymulację układu sygnałowego GnRH w przedniej części podwzgórza (Jiang i in., 2015).

1.3.3. Wpływ PNX na procesy poznawcze i zapamiętywanie

Kolejne badania przeprowadzone na gryzoniach, oprócz wyżej wymienionego wpływu anksjolitycznego, dostarczyły informacji na temat wpływu egzogennej PNX na funkcje poznawcze, zapamiętywanie i rozpoznawanie obiektów oraz ich lokalizacji (Jiang i in., 2015). Obustronne wstrzyknięcie PNX bezpośrednio do hipokampa umożliwiło gryzoniom zapamiętywanie obiektów i szczegółów przestrzennych, nawet po krótkich okresach treningowych trwających 5 sekund, podczas gdy zwierzęta kontrolne potrzebowały dłuższego czasu do ich zapamiętania (Jiang i in., 2015). Dodatkowo, trzy dni po zakończeniu treningu uczenia, zwierzęta, którym podawano PNX, wykazywały się lepszą pamięcią, niż zwierzęta kontrolne. Co ciekawe, mamy tu kolejny przykład na to, że działanie PNX jest zależne od receptora GnRH, ponieważ w wyniku zastosowania antagonisty receptora GnRH – cetroreliksu (podanego we wlewie do komory bocznej), doszło do całkowitego zniesienia działania PNX na procesy zapamiętywania (Jiang i in., 2015). W kolejnych badaniach u myszy stwierdzono, że dokomorowe podanie PNX może zmniejszyć upośledzenie pamięci indukowanej przez peptyd amyloidu-β1–42 i skopolaminę, co sugeruje możliwość wykorzystania PNX jako leku w terapii choroby Alzheimera (AD) (Jiang i in., 2015). Chociaż stężenia PNX w osoczu nie wykazały różnic pomiędzy grupami pacjentów z łagodną postacią AD, łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych, czy dolegliwościami związanymi z pamięcią subiektywną (Yuruyen i in., 2017), stwierdzono korelację pomiędzy poziomem PNX w osoczu, a subiektywnymi schorzeniami pamięci u pacjentów geriatrycznych z łagodnym upośledzeniem funkcji poznawczych (MCI) (Yuruyen i in., 2017). Interesujące jest to, że średnie stężenie PNX w surowicy okazuje się być ujemnie skorelowane z pamięcią logiczną, tak więc obniżony poziom PNX w osoczu powinien być potencjalnie brany pod uwagę w początkowych stadiach MCI jako symptom prognostyczny. Powyższe wyniki mogą sugerować, że niski poziom PNX w osoczu może być parametrem predykcyjnym w początkowych stadiach chorób, którym towarzyszą zaburzenia procesów poznawczych.

1.3.4. Wpływ PNX na układ sercowo-naczyniowy

PNX została wykryta w sercu szczura za pomocą immunoenzymatycznego testu (ELISA) w dość wysokim stężeniu wynoszącym 550 pg/g (Yosten i in., 2013). Ze względu na tak wysoką ekspresję, wysunięto hipotezę dotyczącą wpływu PNX na funkcje sercowo-naczyniowe. W modelu niedokrwiennym serca wykorzystującym technikę Langendorffa, po wywołaniu niedokrwienia, a następnie reperfuzji, poziom białka PNX wzrastał w tkance sercowej (Rocca i in., 2018), co może wskazywać na kardioprotekcyjne działanie tego peptydu. Perfuzja izolowanych serc szczurów roztworem PNX zmniejszała kurczliwość i relaksację mięśnia sercowego (Rocca i in., 2018), a obserwowany spadek kurczliwości kardiomiocytów był związany ze zwiększoną fosforylacją kinazy białkowej B **(**PKB), wzrostem aktywności śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) i kinazy regulowanej sygnalizacją zewnątrzkomórkową (Erk1/2) (Rocca i in., 2018). Poprzez aktywację tego szlaku, tlenek azotu (NO) zmniejsza prądy kanałów wapniowych typu L i fosforylację troponiny I, przyczyniając się do hamowania kurczliwości mięśnia sercowego. Jednocześnie ujemny efekt lusitropowy wywołany przez PNX umożliwia odpowiednie napełnianie komór krwią. Kolejne publikacje donoszą, że egzogenne podanie PNX szczurom zmniejsza wielkość zawału, wyrażonego jako procent masy lewej komory, z 73% w sercach poddawanych niedokrwieniu i reperfuzji bez PNX, do 34% z podaną PNX. W tym przypadku zwiększone poziomy fosforylacji czynnika aktywującego przeżycie (SAFE) i kinazy ratunkowej po uszkodzeniu reperfuzyjnym (RISK) mogą być zaangażowane, wraz z PNX, w obniżenie czynników proapoptotycznych, takich jak Bax, kaspaza 3, cytochrom C i p38, oraz wzrost poziomu białka antyapoptotycznego - Bcl-2 (Rocca i in., 2018). Niedawno przeprowadzone badania poziomu PNX w surowicy u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wykazały, że stężenia tego neuropeptydu we krwi u tej grupy osób były znacznie niższe, niż u osób zdrowych (Akdu i in., 2022). Dodatkowo, ostatnio przedstawione dowody sugerujące ochronne działanie PNX w miażdżycy wywołanej przez utleniony cholesterol LDL (ox-LDL) (Wei i in., 2021), w połączeniu z jej zmienionym stężeniem w nadciśnieniu tętniczym i jej proponowanymi właściwościami kardioprotekcyjnymi, mogą potencjalnie uczynić z niej narzędzie farmaceutycznego leczenia chorób z nadciśnieniem lub dysfunkcją serca.

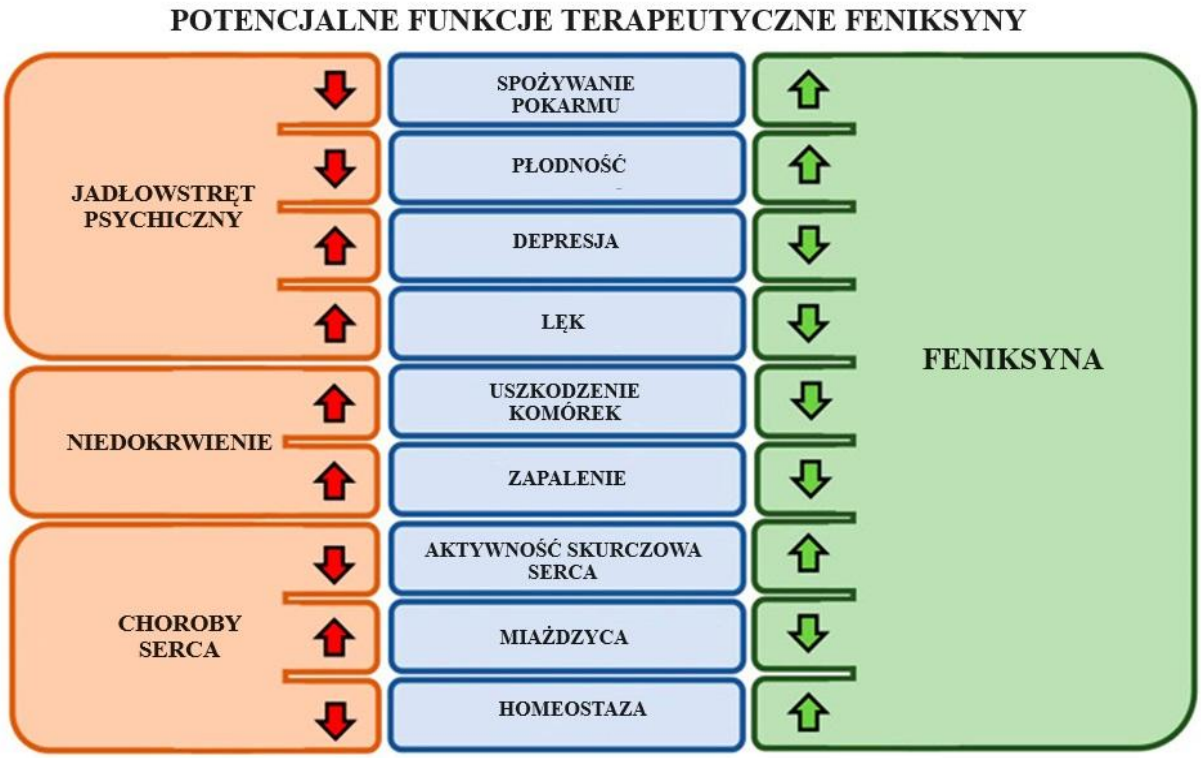
1.3.5. Wpływ PNX na regulację pobierania pokarmu

Wykrycie PNX w obszarach mózgu regulujących pobieranie pokarmu i wody, takich jak PVN, ARC, jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza (VMH), a także NTS (Pałasz i in., 2015; Schwartz i in., 2000), rzuciło światło na funkcję PNX w regulacji pobierania pokarmu oraz w regulacji pragnienia. Dokomorowe (i.c.v) wstrzyknięcie PNX doprowadziło do znacznego zwiększenia spożycia pokarmu u szczurów, czego nie zaobserwowano po wstrzyknięciu PNX dootrzewnowo (Friedrich i in., 2019; Schalla i in., 2017). Dodatkowo, zwiększenie przyjmowania pokarmu następowało, gdy PNX wstrzyknięto w fazie dziennej, natomiast w fazie nocnej przyjmowanie pokarmu nie było stymulowane, co wskazuje na to, że PNX wywiera ośrodkowy efekt oreksygeniczny związany z rytmami dobowymi (Schalla i in., 2017). W przeciwieństwie do oreksygenicznego działania PNX, wykazano również działanie anoreksygenne tego neuropeptydu u chorych na anoreksję ciężarnych kobiet, u których stężenie PNX w surowicy było wysokie przy obniżonym przyjmowaniu pokarmu (Çimenli i in., 2022). Z kolei niższe stężenia PNX w surowicy odnotowano u niedożywionych nastolatków chorych na anoreksję, natomiast częściowy odzysk masy ciała normalizował stężenie PNX we krwi (Pałasz i in., 2021). Z racji tego, że PNX jest wytwarzana w komórkach tłuszczowych, niższe poziomy PNX u osób z anoreksją mogą wynikać ze zmniejszonej zawartości PNX w tkance tłuszczowej (Pałasz i in., 2021). Jeżeli chodzi o regulację pragnienia stwierdzono, że wstrzyknięcie i.c.v PNX-20 stymulowało spożycie wody zarówno u samców, jak i samic szczurów, zaś zablokowanie receptora GPR173 przed podaniem PNX-20, prowadziło do zahamowania pragnienia (Haddock i in., 2020). Sugerowano także rolę PNX w homeostazie płynów i elektrolitów zależną od wazopresyny. Wykazano, że PNX-20 zwiększa uwalnianie wazopresyny in vitro w eksplantach podwzgórzowo-przysadkowych, jak również zwiększa poziom wazopresyny in vivo w osoczu zwierząt, ze szczytem około 20 minut po jej podaniu (Gasparini i in., 2018). Jedne z ostatnich opracowań naukowych donoszą także, że PNX występuje w komórkach alfa i beta trzustki, a jej uwalnianie, indukowane wysokim poziomem glukozy, prowadzi do zwiększonego wydzielania insuliny (Billert i in., 2019), co wskazuje na udział PNX nie tylko w regulacji przyjmowania pokarmu, ale także w kontrolowaniu glikemii. Natomiast najnowsze badania wskazują, że pomiar PNX w surowicy może być bardzo przydatny w diagnozowaniu cukrzycy typu 2 (Can i in., 2024).

1.3.6. Wpływ PNX na procesy związane z nocycepcją

Na rolę PNX w odczuwaniu bólu po raz pierwszy rzuciły światło badania Lyu i in. przeprowadzone w 2013 roku. Wyniki tych badań pokazały, że PNX występuje nie tylko w strukturach mózgowia, ale także w rdzeniowym odcinku nerwu trójdzielnego oraz w zwojach DRG (Lyu i in., 2013). Kolejne badania wykazały obecność tego neuropeptydu w neuronach NTS (Prinz i in., 2017), a także we włóknach nerwowych blaszek powierzchniowych I i II rogu grzbietowego rdzenia kręgowego (Lepiarczyk i in., 2020), co ewidentnie wskazuje na ich czuciowe pochodzenie, miedzy innymi ze zwojów DRG. Powszechnie uznaje się, że nocycepcja, taka jak ból termiczny, mechaniczny lub neuropatyczny, jest przenoszona głównie przez pierwotne neurony o małej średnicy doprowadzające informację nerwową do powierzchownych warstw rogu grzbietowego (Julius i Basbaum, 2001). Dodatkowo, PNX ulega ekspresji w heterogenicznej grupie czuciowych komórek zwojowych o różnych rozmiarach (od małych do dużych) co sugeruje, że peptyd ten może uczestniczyć w przekazywaniu informacji o różnych modalnościach sensorycznych (Lyu i in., 2013).

Kolejne badania dotyczące biologicznej roli PNX w OUN wskazują, że peptyd ten może również wywierać działanie świądogenne. Wstrzyknięcie podskórne PNX w kark myszy powodowało nadmierne drapanie, a efekt ten był odwracalny po zastosowaniu agonisty receptora opioidowego kappa (Cowan i in., 2015). Ponieważ przypuszcza się, że świąd jest łagodnym uczuciem bólu w kontekście sygnalizacji neuronalnej, potwierdza to dodatkowo udział PNX w modulacji czucia bólu (Cowan i in., 2015). Pomimo, że funkcjonalna rola PNX w przetwarzaniu sensorycznym nie jest jeszcze znana, ostatnie badania pokazały, że PNX jest wielowymiarowym peptydem (McIlwraith i in., 2022), wskazując na jej rolę w regulacji wielu funkcji fizjologicznych i patologicznych **(Rycina 2)**.



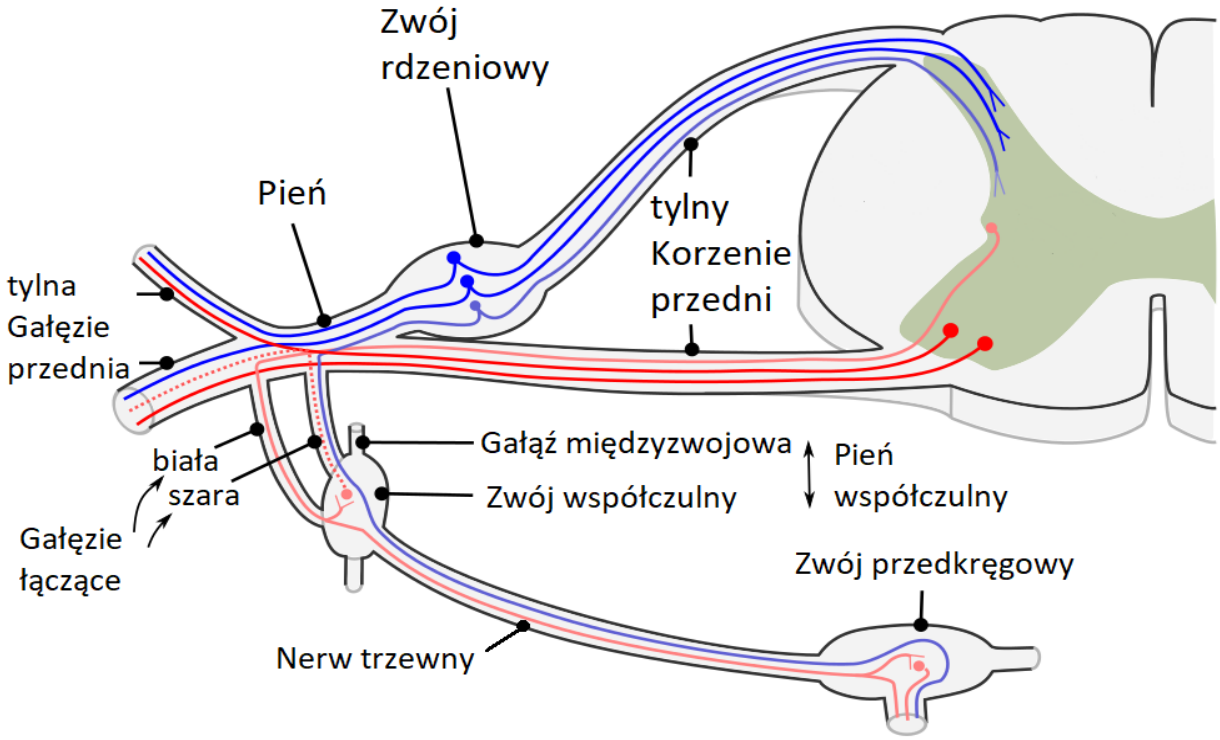
Rycina 2. Potencjalne skutki terapeutyczne PNX – wpływ patologii (czerwone strzałki) na funkcje fizjologiczne (pole niebieskie) i powiązane możliwe skutki terapeutyczne PNX (zielone strzałki). Źródło: Friedrich, T. i Stengel, A. (2023). Current state of phoenixin—the implications of the pleiotropic peptide in stress and its potential as a therapeutic target. *Frontiers in Pharmacology,* 14. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1076800.

1.4. Budowa zwojów DRG

DRG jest strukturą OUN skupiającą perykariony (ciała komórkowe) czuciowych komórek nerwowych (Catala i Kubis, 2013). Zwoje DRG są strukturami parzystymi, ułożonymi wzdłuż rdzenia kręgowego w pochewce opony twardej (w przestrzeniach międzykręgowych), otoczonymi jedynie cienką warstwą płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF). U świni domowej wyróżniamy od 35 do 38 par zwojów DRG: 7 szyjnych (C), 13-16 piersiowych (Th), 6 lędźwiowych (L), 4 krzyżowe (S) oraz 5 ogonowych (Cq) (Toossi i in., 2021; Van Son i in., 2019). Neurony czuciowe posiadają charakterystyczną budowę pseudojednobiegunową, gdzie pojedyncza wypustka wychodząca z ciała komórki nerwowej rozdziela się na dwie części: obwodową i centralną. Gałąź obwodowa rozciąga się od ciała komórki do narządów na obwodzie, w tym skóry, stawów i mięśni, natomiast gałąź centralna odchodzi od ciała komórki do rdzenia kręgowego (Esposito i in., 2019).

W zwoju DRG możemy wyróżnić trzy klasy komórek, które różnią się rozmiarem w zależności od gatunku zwierzęcia (20µm-120µm) oraz 3 rodzaje włókien: włókna Aβ szybko

przewodzące i reagujące na bodźce mechaniczne, włókna Aδ reagujące na bodźce termiczne i mechaniczne, oraz włókna typu C, zazwyczaj reagujące na produkty termiczne, mechaniczne i chemiczne o dużym natężeniu. Komórki małe (średnica do 40 µm) zawierają w głównej mierze włókna niezmielinizowane typu C, natomiast włókna Aδ stanowią mniejszą ilość. Głównym rodzajem włókien występujących w komórkach średnich (średnica od 40-70µm) są włókna Aδ oraz występujące w mniejszej ilości włókna typu C i Aβ, natomiast komórki duże (średnica powyżej 70 µm) zawierają głównie włókna Aβ oraz kilka włókien typu Aδ (Lawson, 2005). Ciała komórek nerwowych w zwojach DRG są otoczone cienką warstwą komórek glejowych tzw. komórek satelitarnych, tworzącą barierę oddzielającą neurony w zwoju, ponadto pełnią funkcję ochronną i utrzymują odpowiednią homeostazę mikrośrodowiska neuronów (Hanani, 2005; Maniglier i in., 2022; Znaor i in., 2007). Schematyczny rysunek pokazujący ułożenie zwoju DRG wraz z włóknami przedstawione zostały na **Rycinie 3.**



Rycina 3. Schematyczny rysunek przedstawiający neurony DRG (kolor niebieski) z włóknem aferentnym biegnącym na obwód, oraz włóknem centralnym przekazującym informacje do ośrodkowego układu nerwowego (CUN). Źródło: https://szkolaanatomii.pl/2018/09/06/prokuracja-w-wenecji-i-nerwy-rdzeniowe-co-je-laczy/.

1.5. Neuroprzekaźniki

Zwoje DRG odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu informacji czuciowych z receptorów obwodowych do CUN, integrując bodźce takie jak ból, dotyk, temperatura czy propriocepcja. W przewodzeniu informacji czuciowej pośredniczą neuroprzekaźniki obecne w neuronach czuciowych zwojów DRG, które mogą także modulować pobudliwość tych komórek nerwowych. Poniżej opisano neurotransmitery wybrane do badań stanowiących niniejszą rozprawę doktorską.

1.5.1. CGRP

Peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP) jest 37-aminokwasowym neuropeptydem zlokalizowanym w CUN i OUN, działającym jako silny czynnik rozszerzający naczynia krwionośne, a także jako neuroprzekaźnik (Brain i in., 1986; Rosenfeld i in., 1983). Dotychczasowe badania wykazały, że CGRP wraz z substancją P (SP), to związki przenoszące sygnały w neuronach aferentnych u wszystkich dotychczas przebadanych gatunkach ssaków w tym człowieka (Haberberger i in., 2019; Rees i in., 2024), konia (Gibson i in., 1984), wielbłąda (Javed i in., 2021), świni (Bossowska i Majewski, 2012; Janikiewicz i in., 2021, 2025; Lepiarczyk i in., 2015), kota (Traub i in., 1990), świnki morskiej (Gibson i in., 1984), szczura (Rees i in., 2024) i myszy (Shiers i in., 2020; Xiang i in., 2022).

CGRP występuje w dwóch izoformach: alfa (α-CGRP) i beta (β-CGRP). Badania immunohistochemiczne i hybrydyzacja in situ wykazały, że α-CGRP dominuje w nerwach czuciowych, komórkach nerwowych TG oraz zwojach DRG (Muddhrry i in., 1988), podczas gdy β-CGRP, oprócz komórek czuciowych (Noguchi i in., 1990), obecny jest w neuronach ruchowych i ulega ekspresji w jelitowym układzie nerwowym (Muddhrry i in., 1988). CGRP wydzielane z neuronów czuciowych zwoju TG odgrywa istotną rolę w patologii migreny, na którą ma wpływ gęste unerwienie okołonaczyniowe w układzie trójdzielnym (Olesen i Edvinsson, 1991). Stymulacja ludzkiego zwoju TG powoduje wzrost poziomu CGRP w krążeniu mózgowym, prowadząc w konsekwencji do rozszerzenia naczyń, degranulacji komórek tucznych oraz neurogennego stanu zapalnego (Iyengar i in., 2019), który wywołuje przedłużające się stany migrenowe (Russo, 2015; Tepper i in., 2018).

Zgodnie z dostępną literaturą zarówno α-CGRP, jak i β-CGRP występują w neuronach DRG małej i średniej wielkości, podczas gdy neurony DRG o dużej średnicy wykazują głównie ekspresję mRNA dla α-CGRP (Noguchi i in., 1990). Jego ekspresja w neuronach

DRG reagujących na bodźce termicze, chemiczne oraz mechaniczne wskazuje, że CGRP uczestniczy w przekazywaniu i modulowaniu sygnałów bólowych (Garry i Hargreaves, 1992; Russell i in., 2014). Wysokie stężenie CGRP stwierdzono w blaszkach powierzchniowych I i II rogu grzbietowego rdzenia kręgowego (Lepiarczyk i in., 2020), odpowiadających centralnym zakończeniom pierwotnych neuronów DRG i TG (Eftekhari i Edvinsson, 2010; Russell i in., 2014). W rdzeniu kręgowym peptyd ten odgrywa kluczową rolę w centralnym przetwarzaniu sygnałów bólowych, uczestnicząc zarówno w przekazywaniu informacji z pierwotnych aferentów nocyceptywnych, jak i w modulacji transmisji bólowej (Iyengar i in., 2017).

Wydzielanie obwodowe CGRP z wolnych zakończeń nerwowych włókien typu C odgrywa rolę w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek i proces zapalny, gdzie razem z innymi mediatorami zapalnymi, przyczynia się do sensydyzacji obwodowej rozszerzając pola recepcyjne oraz zwiększając odpowiedź neuronów na bodźce bólowe (hiperalgezja, allodynia) (Liu i in., 2025; Russell i in., 2014).

W żeńskim układzie rozrodczym CGRP, pochodzący z afferentnych włókien czuciowych, reguluje przepływ krwi i odgrywa rolę w dojrzewaniu szyjki macicy (Kirby i in., 2005).

1.5.2. SP

Substancja P (SP) jest neuropeptydem z rodziny tachykinin składającym się z 11 aminokwasów (Moraes i in., 2014). W CUN największe zagęszczenie SP występuje w istocie czarnej, ciele migdałowatym oraz rogu grzbietowym rdzenia kręgowego, (Ribeiro-da-Silva i Hökfelt, 2000). W DRG SP wykryto u takich gatunków jak: gryzonie (Lawson i in., 1997; Lin i Chen, 2018; Simões i in., 2018), świnie (Bossowska i in., 2009; Bossowska i Majewski, 2012; Janikiewicz i in., 2021, 2025), małpy (Battaglia i Rustioni, 1988), delfiny (Bombardi i in., 2010) czy koty (Danuser i in., 1997).

SP jest syntetyzowana w małych i średnich neuronach DRG, magazynowana w pęcherzykach synaptycznych oraz transportowana szybkim transportem aksonalnym, zarówno do zakończeń wypustek centralnych, jak i obwodowych (Hoyer i Bartfai, 2012). Jej ekspresja w neuronach DRG oraz rogach tylnych rdzenia kręgowego (blaszki I, II i V) wskazuje na istotny udział SP w pierwotnej aferentnej transmisji czuciowej (Ribeiro-da-Silva i Hökfelt, 2000). W warunkach intensywnej stymulacji nocyceptywnej SP jest wydzielana z centralnych zakończeń włókien w rogach tylnych rdzenia kręgowego, gdzie wiążąc się z receptorami neurokininy typu 1 (NK1) na neuronach II-rzędu, prowadzi do zwiększenia ich pobudliwości i

wzmocnienia transmisji bólu na poziomie rdzenia (Gautam i in., 2016). Z kolei SP uwalniana z obwodowych zakończeń włókien nocyceptywnych, obok CGRP, jest jednym z kluczowych mediatorów zapalenia neurogennego, gdzie działając bezpośrednio na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych oraz mięśnie gładkie, moduluje reakcje naczyniowe i zapalne (Steinhoff i in., 2014; Zieglgänsberger, 2019). W tym przypadku SP zwiększa przepuszczalność naczyń włosowatych, prowadząc do wynaczynienia osocza i obrzęku tkanek (Saria, 1984). Zwiększone uwalnianie SP, lub podwyższona ekspresja jej receptorów, zostało powiązane z różnymi stanami patologicznymi, takimi jak ostre i przewlekłe zapalenie, infekcje, astma oraz zaburzenia afektywne i uzależniające (Steinhoff i in., 2014).

Oprócz dobrze ugruntowanej roli w sygnalizacji nocyceptywnej i reakcjach zapalnych, SP jest również pośrednio zaangażowana w regulację rozwoju dojrzewania płciowego u samic myszy, gdzie poprzez stymulację wydzielania gonadotropin, prowadzi do aktywacji neuronów eksprymujących Kiss, co pozwala na osiągnięcie pełnej dojrzałości płciowej (Simavli i in., 2015). W układzie rozrodczym szczurów, analiza ekstraktów tkanek wykazała, że najwyższe stężenie SP występuje w pochwie, a następnie w szyjce macicy, endometrium i jajnikach, a jej poziom w narządach rozrodczych znacznie wzrasta po owariektomii, natomiast ulega obniżeniu w czasie ciąży (Traurig i in., 1984). W przypadku obwodowego uwalniania SP z zakończeń włókien czuciowych unerwiających szyjkę macicy (Collins i in., 2002; Papka i in., 1985), neuropeptyd ten prowadzi do wywołania bólu neurogennego i procesów zapalnych (Dray, 1996). Co ciekawe, podanie SP szczurom po usunięciu jajników naśladuje aspekty neurogennego zapalenia obserwowanego w szyjce macicy w trakcie porodu, powodując rekrutację komórek odpornościowych, rozszerzenie naczyń krwionośnych i ekstrawazację osocza, co sugeruje, że SP może odgrywać ważną rolę w dojrzewaniu szyjki macicy (Collins i in., 2002) i może być zaangażowana w przebudowę tkanek (Dray, 1996). Z kolei u ciężarnych szczurzyc, szczególnie w ostatnim trymestrze ciąży, dochodzi do spadku poziomu SP w szyjce macicy, z jednoczesnym wzrostem zarówno ekspresji SP, jak i jej mRNA, w zwojach L6-S1 DRG, przy czym zmiany te są dodatnio skorelowane ze stężeniem estrogenu, sugerując wpływ tego neuropeptydu na dojrzewanie szyjki macicy w późnej ciąży (Mowa i in., 2003; Mowa i Papka, 2004).

1.5.3. nNOS

Ludzka neuronalna syntetaza tlenku azotu (nNOS) składa się z 1434 aminokwasów o masie cząsteczkowej 160,8 kDa i znajduje się na chromosomie 12 (Boissel i in., 1998). Istnieją trzy genetycznie różne izoformy NOS: nNOS (znana również jako, typ I, NOS-I i NOS-1) będąca izoformą występującą w tkankach neuronalnych; indukowalna syntaza tlenku azotu (znana również jako iNOS, typ II, NOS-II i NOS-2) będąca izoformą, która może być syntetyzowana po indukcji przez cytokiny prozapalne lub endotoksyny; śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (znana również jako eNOS, typ III, NOS-III i NOS-3) będąca izoformą ulegającą ekspresji w komórkach śródbłonka (Bredt, 1999). Spośród trzech izoform NOS, nNOS stanowi główne źródło NO w neuronach.

nNOS w CUN jest zaangażowana nie tylko w funkcje neurotransmisyjne, ale także w modulowanie procesów poznawczych, takich jak uczenie się, pamięć i neurogeneza (Zhou i Zhu, 2009).

W OUN immunoreaktywność dla nNOS znaleziono w średnich i małych neuronach czuciowych DRG szczura (Fiallos-Estrada i in., 1993), myszy (Ahlawat i in., 2014), małpy (Xu Zhang i in., 1993) oraz świni (Janikiewicz i in., 2025). Oprócz DRG, włókna nerwowe zawierające nNOS występują również w rogu grzbietowym rdzenia kręgowego szczura, wykazując największą gęstość na terenie blaszki II (Xu Zhang i in., 1993).

Dane literaturowe wskazują na duże znaczenie nNOS w procesach związanych z transmisją bólową. Ekspresja nNOS zwiększa się w przebiegu przewlekłego bólu, przy czym podczas bólu wywołanego czynnikami prozapalnymi, poziom nNOS ulega zwiększeniu w hamujących interneuronach rogu grzbietowego, natomiast w trakcie trwania bólu neuropatycznego, takiego wzrostu nie obserwowano (Ahlawat i in., 2014). Zwiększona produkcja NO wydaje się także odgrywać rolę ochronną dla neuronów DRG po uszkodzeniu nerwów obwodowych (Ahlawat i in., 2014). Jednocześnie nadprodukcja NO jest uznawana za jeden z mechanizmów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych (ekscytotoksyczność po udarze, stwardnieniu rozsianym, chorobie Alzheimera i Parkinsona (Steinert i in., 2010)).

Jeżeli chodzi o narządy rozrodcze, szczególnie wyraźną ekspresję nNOS zaobserwowano w jajnikach oraz w szyjce macicy (Ledingham i in., 2000; Luo i in., 2021). W szyjce macicy zarówno kobiet w ciąży, jak i niebędących w ciąży, nNOS występuje głównie w pośrednich i powierzchniowych warstwach komórek nabłonkowych. Podobne rozmieszczenie obserwowano u gryzoni, gdzie NO indukował dojrzewanie szyjki macicy

(Chwalisz i in., 1997), a jego uwalnianie z tego obszaru było wyraźnie podwyższone podczas porodu (Buhimschi i in., 1996).

1.5.4. GAL

Galanina (GAL) jest neuroendokrynnym neuropeptydem składającym się z 29 lub 30 aminokwasów, odkrytym w przewodzie pokarmowym świń przez Tatemoto i wsp., gdzie może wpływać na skurcz mięśni gładkich i metabolizm glukozy (Tatemoto i in., 1983). Oprócz układu pokarmowego, GAL ulega szerokiej ekspresji w CUN i OUN (Lang i in., 2015).

W układzie czuciowym GAL występuje w stosunkowo nielicznej populacji neuronów DRG, głównie o małych rozmiarach (Skofitsch i Jacobowitz, 1985; Xu i in., 2012), co wykazano zarówno u człowieka (Landry i in., 2003), jak i różnych gatunków zwierzat, w tym myszy (Holmes i in., 2003), szczura (Zhang i in., 1995), świni (Bossowska i in., 2009; Bossowska i Majewski, 2012; Janikiewicz i in., 2021, 2025) oraz małpy (X. Zhang i in., 1993). Ponadto obecność GAL stwierdzono w powierzchniowych warstwach rogu grzbietowego rdzenia kręgowego szczura (Melander i in., 1986), co wskazuje na jej udział w przekazywaniu i modulacji bodźców czuciowych. Sugeruje się, że GAL odgrywa głównie rolę antynocyceptywną, ponieważ jej ekspresja znacznie wzrasta po urazie, szczególnie w DRG i rdzeniu kręgowym (Xu i in., 2012). Przykładowo u dorosłych gryzoni ekspresja GAL dramatycznie wzrasta w DRG po aksotomii obwodowej (Corness i in., 1996; Hökfelt i in., 1987), szczególnie w neuronach małych rozmiarów (Hu i McLachlan, 2001; Xu i in., 2012; X. Zhang i in., 1993). Inne dane literaturowe donoszą, że nie tylko całkowite przecięcie nerwów, ale także luźne ich podwiązanie (Ma i Bisby, 1997; Nahin i in., 1994), czy zakażenie wirusem opryszczki (Henken i Martin, 1992), powodują zwiększenie występowania GAL w szczurzych i/lub mysich neuronach DRG. Z kolei badania na myszach z usuniętym genem GAL pokazują, że mają one o 15% mniej neuronów DRG i upośledzoną zdolność regeneracyjną, co sugeruje działanie neurotroficzne tego neuropeptydu (Holmes i in., 2003).

W układzie rozrodczym niewielką liczbę włókien zawierających GAL obserwowano głównie w mięśniu macicy oraz w pobliżu naczyń krwionośnych, sugerując jej rolę jako lokalnego modulatora aktywności naczyniowej (Papka i Traurig, 1989). Ponadto wykazano przeciwzapalną funkcję GAL w mięśniu macicy szczurów, gdzie zwiększenie ekspresji tego neuropeptydu w odpowiedzi na stan zapalny, wspomagało usuwanie wysięku z jamy macicy (Jana i in., 2021).

Obecność GAL wykazano także w niewielkiej liczebnie populacji neuronów czuciowych zwojów DRG (L6 i S1) unerwiających szyjkę macicy (Papka i in., 1991).

1.5.5. CRT

Kalretynina (CRT) - cytozolowe białko o masie 29 kD (Rogers, 1987), jest jednym z trzech, obok kalbindyny i parwalbuminy, najlepiej poznanych białek wiążących jony wapnia.

Występowanie CRT odnotowano zarówno w CUN (rdzeń kręgowy), jak i OUN (DRG) (Papka i in., 1999). Rozmieszczenie CRT, głównie w blaszkach powierzchniowych rdzenia kręgowego, sugeruje jej rolę w szlakach czuciowych, zwłaszcza szlakach nocyceptywnych (Ren i in., 1993), co może wskazywać na to, że rola CRT w funkcjonowaniu komórek nie ogranicza się tylko do buforowania wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Rogers, 1987). Obecność CRT w DRG została udokumentowana u wielu zwierząt doświadczalnych takich jak: szczur (Ichikawa i in., 1993; Papka i in., 1999; Ren i in., 1993), mysz (Ninomiya i in., 1993), drób (Philippe i Droz, 1989) czy świnia (Bossowska i in., 2009; Janikiewicz i in., 2025).

CRT uczestniczy w regulacji aktywności różnych typów neuronów czuciowych. Obecność CRT w DRG drobiu obserwowana była w dużych neuronach czuciowych (6%) z grubymi mielinowanymi aksonami oraz w małych neuronach (14%) z cienkimi, pozbawionymi mieliny lub słabo mielinowanymi aksonami (Philippe i Droz, 1989). Natomiast, u szczura obserwowano występowanie CRT we wszystkich rozmiarach neuronów czuciowych zarówno małych, średnich jak i dużych (Papka i in., 1999). Obecność CRT, głównie w dużych komórkach DRG, uważana jest za marker proprioceptorów mięśniowych w układzie nerwowym (Ichikawa i in., 2005). Wysoka ekspresja CRT w komórkach DRG na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego sugeruje jej tymczasową rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, zanim neurotrofiny przejmą precyzyjną kontrolę homeostazy wapnia (Ambrus i in., 1998; Larmet i in., 1992).

Należy podkreślić, że neurony CRT^+ zwojów DRG są również źródłem włókien czuciowych unerwiających macicę. U szczura włókna nerwowe zawierające CRT i pochodzące z neuronów zwojów DRG L6-S1 unerwiają mięśniówkę oraz naczynia krwionośne rogów oraz szyjki macicy, stabilizując wewnątrzkomórkowe poziomy wapnia, co jest istotne dla przewodnictwa synaptycznego (Papka i in., 1999). CRT jest również definiowana jako marker prawidłowo funkcjonującego podścieliska endometrium, a obniżenie jej ekspresji może wskazywać na zaburzenia struktury anatomicznej tej tkanki (Al Moghrabi i in., 2007).

1.5.6. PACAP

Peptyd aktywujący cyklazę adenylanową (PACAP), wyizolowany po raz pierwszy w 1989 r. z podwzgórza owiec, należy do nadrodziny wazoaktywnych peptydów jelitowych ((VIP)/sekretyny/hormonu uwalniającego hormon wzrostu/glukagonu). Występuje w dwóch aktywnych formach złożonych z 38 i 27 aminokwasów. Liczne badania wykazały, że PACAP prezentuje wielokierunkowe działanie biologiczne, w tym właściwości przeciwzapalne, przeciwalergiczne, funkcje ochronne w układzie sercowo-naczyniowym, oraz uczestniczy w procesach tworzenia i gojenia chrząstek (Toth i in., 2020). Ponadto PACAP odgrywa istotną rolę neuroprotekcyjną, chroniąc neurony przed apoptozą i działaniem neurotoksyn, a także wykazuje korzystne efekty w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Vaudry i in., 2002).

Immunoreaktywność PACAP wykryto w wielu obszarach CUN i OUN ssaków, w tym w rdzeniu kręgowym (blaszki powierzchniowe I i II) gryzoni (Dun i in., 1996), oraz w licznych małych i średnich komórkach DRG (Dun i in., 1996). Ekspresja PACAP w szczurzych DRG znacząco się zwiększała po jednostronnym zapaleniu tylnej łapy wywołanego adiuwantem (Zhang i in., 1996), a także po uszkodzeniu nerwu (Zhang i in., 1995), sugerując ważną funkcję PACAP w modulowaniu przeżycia i plastyczności neuronów czuciowych. Badania na hodowlach komórkowych neuronów DRG wykazały, że PACAP zwiększa przeżywalność hodowanych neuronów DRG, a efekty te porównywalne były z działaniem czynnika wzrostu nerwów (NGF) (Lioudyno i in., 1998).

W późnej ciąży synteza PACAP wzrasta w DRG na poziomie L6-S1, podczas gdy w rdzeniu kręgowym i szyjce macicy ulega obniżeniu. Po leczeniu estrogenem poziomy mRNA PACAP w L6-S1 ulegają zwiększeniu (Papka i in., 2006). W warunkach zapalnych w macicy obserwuje się spadek mRNA PACAP i jego receptora (PAC1) (Jana i in., 2022), natomiast w DRG odnotowuje się tendencję do wzrostu ekspresji (Bulc i in., 2019), co może wskazywać na jego udział w odpowiedzi neuroimmunologicznej na stan zapalny żeńskich narządów rozrodczych.

1.5.7. CART

Transkrypt powiązany z kokainą i amfetaminą (CART) po raz pierwszy zidentyfikowano w prążkowiu szczura, gdzie jego poziomy wzrosły po podaniu kokainy i amfetaminy (Douglass i in., 1995). CART może występować w dwóch izoformach: CART (55-102) oraz CART (62-102) (Dylag i in., 2006), które ulegają szerokiej ekspresji w CUN (Douglass i in., 1995), i mogą uczestniczyć w regulacji zachowań żywieniowych,

emocjonalnych oraz stresu (Balkan i in., 2012; Yang i in., 2005). Obecność CART wykazano również w obszarach anatomicznych związanych z przekazywaniem i przetwarzaniem sensorycznym: rogi grzbietowe rdzenia kręgowego, subpopulacja komórek zwojowych siatkówki, czy komórki mitralne w opuszce węchowej (Kuhar i Dall Vechia, 1999).

W OUN obecność CART odnotowano w DRG u takich gatunków jak: szczur (Broberger i in., 1999), mysz (Goswami i in., 2014) i świnia (Zacharko-Siembida i in., 2014). W DRG u świni CART pojawia się w około 5% populacji pierwotnych neuronów czuciowych, z czego zdecydowaną większość (około 95%) stanowią komórki małej i średniej wielkości (Zacharko-Siembida i in., 2014). Wykazano również, że większość włókien nerwowych zawierających CART, obserwowanych w powierzchownych blaszkach (szczególnie w blaszce I) rdzenia kręgowego, pochodzi z neuronów czuciowych. Włókna czuciowe $CART^+$ zawierają również klasyczne neuropetydy bólowe - CGRP oraz SP, co wskazuje na możliwą rolę CART w modulacji przewodzenia bólu i procesach sensorycznych (Kozsurek i in., 2007). CART wykazuje dwufunkcyjną rolę w modulacji bólu. Dooponowe podanie tego peptydu powodowało działanie pronocyceptywne obserwowane jako skrócenie czasu latencji wycofania tylnej łapy myszy w odpowiedzi na bodźce termiczne, przyczyniając się do rozwoju hiperalgezji (Ohsawa i in., 2000). W bólu neuropatycznym, CART podany dooponowo, łagodzi hiperalgezję i odczuwanie bólu neuropatycznego, w przeciwieństwie do bólu pochodzenia zapalnego, prawdopodobnie poprzez modulację rdzeniowych mechanizmów sensytyzacji centralnej (Damaj i in., 2006), głównie wzmacniając efekt analgetyczny działania morfiny na poziomie rdzenia kręgowego (Damaj i in., 2004). Z kolei w badaniu Yosten i wsp. (2020) wykazano, że w bólu neuropatycznym CART, uwalniany z neuronów DRG, transportowany jest do rdzenia kręgowego i poprzez aktywację receptora GPR160 nasila przekazywanie informacji nocyceptywnej.

1.5.8. SOM

Somatostatyna (SOM) jest szeroko eksprymowana zarówno w CUN jak i OUN, gdzie reprezentowana jest przez dwie aktywne formy: krótszą izoformę (14 aminokwasów) dominującą w układzie nerwowym, oraz dłuższą (28 aminokwasów) charakterystyczną dla przewodu pokarmowego (Rorsman i Huising, 2018).

W CUN SOM pełni głównie rolę neuroprzekaźnika i neuromodulatora kontrolującego sprawność przekaźnictwa synaptycznego i regulującego funkcje neuronów (Pittaluga i in., 2021; Reichlin, 1983). Dodatkowo, obecność gęstego splotu włókien SOM-pozytywnych w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego wskazuje na jej istotną rolę w ośrodkowej modulacji

informacji bólowej (Chapman i Dickenson, 1992; Dalsgaard i in., 1981). Wykazano, że u zwierząt doświadczalnych, zarówno SOM jak i jej analogi (oktreotyd) wykazują, porównywalne z morfiną, działanie antynocyceptywne, a także przeciwzapalne w modelu bólu pooperacyjnego (Carlton i in., 2001; Kumar i in., 2018). Z kolei u ludzi dooponowe i zewnątrzoponowe podanie SOM było skuteczne w leczeniu bólu w terminalnej fazie nowotworu (Mollenholt i in., 1994), a także w klasterowych bólach głowy (Sicuteri i in., 1984). Co ciekawe, dooponowe podanie SOM może również indukować zachowanie drapania, co sugeruje jej udział w ośrodkowej modulacji świądu (Kardon i in., 2014).

SOM oraz jej receptor wykryto także w OUN w neuronach DRG u człowieka (Shi i in., 2014) oraz takich zwierząt jak: szczur (Kashiba i in., 1996; Liu i in., 2021), mysz (Shi i in., 2014), kot (Garry i in., 1989) czy świnia (Bossowska i Majewski, 2012; Gonkowski, 2014; Janikiewicz i in., 2021, 2025).

W neuronach DRG szczura SOM jest obecna w około 9% populacji, głównie komórek małych rozmiarów, i w większości z nich licznie współwystępuje z α-CGRP, co sugeruje, że może prawdopodobnie pełnić funkcję modulacyjną w przekazywaniu bodźców bólowych (Kashiba i in., 1996). SOM działa na receptory SSTR2 zlokalizowane na neuronach DRG, ich pobudzenie prowadzi do zmniejszenia aktywności kanałów jonowych wrażliwych na zakwaszenie (ASIC), spadek stężenia cAMP i aktywności PKA, co przyczynia się do redukcji transmisji nocyceptywnej tych komórek (Liu i in., 2021; Shi i in., 2014). U myszy pozbawionych SOM w neuronach DRG obserwowana jest zwiększona wrażliwość na szkodliwe bodźce termiczne, co potwierdza antynocyceptywną, hamującą rolę tego neuropeptydu w modulacji bólu cieplnego (Huang i in., 2018). Ablacja pierwotnych neuronów aferentnych wykazujących ekspresję SOM doprowadziła do deficytów w odczuwaniu swędzenia (Stantcheva i in., 2016). Z kolei dootrzewnowe podanie egzogennej SOM u szczurów znacząco osłabiło allodynię mechaniczną (Prasoon i in., 2015). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że SOM uczestniczy zarówno w modulacji bólu mechanicznego, jak i termicznego, a także odgrywa rolę w regulacji odczuwania świądu, podkreślając funkcję tego peptydu jako ważnego neuromodulatora w neuronach czuciowych zwojów DRG.

2. Cele

Ostatnie badania wykazały, że PNX może odgrywać istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych, sugerując między innymi jej uczestnictwo w modulacji czucia bólu (Cowan i in., 2015; Lyu i in., 2013), czy w regulacji procesów rozrodczych (Gołyszny i in., 2022).

Ponieważ percepcja bólu oraz przekazywanie informacji czuciowych są w dużej mierze zależne od aktywności neuronów czuciowych zlokalizowanych w zwojach DRG, zasadne wydaje się skierowanie uwagi na obecność i potencjalną rolę PNX właśnie w tych strukturach nerwowych.

Dotychczasowe badania wykazały obecność PNX w mysich i szczurzych zwojach DRG. Jednakże, mimo tych doniesień, w dostępnej literaturze nadal brak jest jakichkolwiek danych dotyczących występowania tego neuropeptydu w zwojach DRG u świni domowej. Jest to istotna luka badawcza, ponieważ świnia domowa jest gatunkiem, który wydaje się być lepszym modelem zwierzęcym w badaniach biomedycznych, niż gryzonie. Biorąc pod uwagę powyższe dane, słuszne wydaje się podjęcie badań dotyczących występowania oraz potencjalnej funkcji PNX w neuronach DRG u tego gatunku zwierzęcia, także w populacji, która zaopatruje czuciowo szyjkę macicy. Uzyskane informacje mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli PNX w przekazywaniu różnorodnych bodźców sensorycznych, a także jej potencjalnego wpływu na funkcjonowanie szyjki macicy, co poszerza naszą wiedzę na temat, zarówno unerwienia, jak mechanizmów fizjologicznych regulujących czynność dróg rodnych.

Uwzględniając powyższe uzasadnienie, postawiono następujące cele badawcze:

1. Ustalenie obecności oraz rozmieszczenia neuronów czuciowych zawierających PNX w wybranych do badania zwojach DRG na poziomach: szyjnym (C), piersiowym (Th), lędźwiowym (L) i krzyżowym (S) rdzenia kręgowego, oraz w populacji wstecznie wyznakowanych neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy;
2. Zbadanie obecności PNX w badanych DRG metodą ultraciśnieniowej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym z potrójnym kwadrupolem MS/MS, jako równoległe potwierdzenie ww. badań jakościowych;
3. Przeprowadzenie analizy morfometrycznej i podobieństwa/różnic we wzorze rozmieszczenia wewnątrzzwojowego (liczba, lokalizacja, średnica) neuronów czuciowych zawierających PNX w wybranych do badania zwojach DRG na

poziomach: szyjnym (C), piersiowym (Th), lędźwiowym (L) i krzyżowym (S) rdzenia kręgowego oraz we wstecznie wyznakowanych neuronach czuciowych unerwiających szyjkę macicy;

4. Ustalenie wzoru kolokalizacji PNX i innych substancji biologicznie czynnych (CART, CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, SOM, SP) w wybranych zwojach DRG z poziomów: C, Th, L oraz S;
5. Ustalenie wzoru kolokalizacji PNX i innych substancji biologicznie czynnych (CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, SOM, SP) w populacji wstecznie wyznakowanych neuronów czuciowych unerwiających szyjkę macicy;

3. Materiał i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadzono na 12 młodych, niedojrzałych płciowo loszkach (8-12 tygodni, 15-20 kg masy ciała (m.c.)) rasy Polska Biała Zwisłoucha. Wszystkie zabiegi chirurgiczne wykonywane były zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie w porozumieniu z Krajową Komisją Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, decyzja NR 40/2020 z dnia 22.07.2020 r.

3.2. Zabiegi chirurgiczne

3.2.1. Pobranie DRG w celu analizy ogólnej obecności PNX w ich neuronach

Wszystkim zwierzętom (N = 6) podano premedykację (atropina, azaperon), a po 30 minutach indukowano i pogłębiano znieczulenie pentobarbitalem sodu i ketaminą. Głębokość znieczulenia monitorowano poprzez badanie odruchu rogówkowego. Następnie od 3, z 6 świń, pobrano śródoperacyjnie lewy i prawy zwój DRG z poziomu L5 z przeznaczeniem do identyfikacji obecności PNX w zwoju metodą spektrometrii mas (MS). Po pobraniu tkanek znieczulenie pogłębiono, a po ustaniu oddychania, wszystkie zwierzęta poddano zabiegowi perfuzji transkardialnej świeżo przygotowanym 4% roztworem paraformaldehydu (PVA). Rdzenie kręgowe, wraz z dołączonymi zwojami DRG, delikatnie wypreparowano, podzielono na neuromery, dotrwalano w 4% PVA (10 minut w temperaturze pokojowej), a następnie trzymano w 18% buforowanej sacharozie do momentu wysycenia tkanki przez cukier.

3.2.2. Pozyskanie DRG do oceny ekspresji PNX w neuronach unerwiających szyjkę macicy

Tak jak opisano powyżej, również w tym przypadku wszystkim zwierzętom (N = 6) podano premedykację w celu wykonania laparotomii w linii środkowej oraz podania 40 µL 5% wodnego roztworu wstecznego znacznika neuronalnego Fast Blue (FB) pod błonę surowiczą ściany szyjki macicy. Trzy tygodnie później (minimalny okres potrzebny do transportu FB do zwojów DRG i wyznakowania neuronów zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy), zwierzęta zostały wprowadzone w głęboką narkozę (zgodnie z tą samą procedurą

opisaną powyżej), a po zatrzymaniu oddechów, poddane zabiegowi perfuzji transkardialnej świeżo przygotowanym 4% roztworem PVA. Po zabiegu, od wszystkich zwierząt pobrano obustronne zwoje DRG. Uwzględniając dostępne dane literaturowe opisujące unerwienie czuciowe szyjki macicy u świni (Wasowicz i in., 1998), w celu określenia występowania PNX w neuronach DRG zaopatrujących ten narząd, pobrano zwoje DRG z poziomów Th (Th10-Th15), L (L1-L6) oraz S (S1-S4). Próbki tkanek były następnie dotrwalone i zanurzone w sacharozie, aż do opadnięcia na dno.

3.3. Spektrometria mas (MS)

Analizę proteomiczną zwojów DRG przeprowadzono w Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Próbki analizowano przy użyciu układu chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS). Identyfikację białek przeprowadzono w pakiecie oprogramowania Proteome Discoverer (wersja 2.4.0.305) przy użyciu pełnej bazy danych Sus scrofa Uniprot (wersja 2022_02). Wyszukiwanie obejmowało białka nierozszczepiające, karboamidometylację ustawioną jako stałą modyfikację, oraz utlenianie i amidację - C końca białka, jako zmienne. Do walidacji dopasowania widma masowego do sekwencji peptydu (PSM) wykorzystano walidator PSM o stałej wartości. Na etapie konsensusu zastosowano podstawowe ustawienia Proteome Discoverer.

3.4. Barwienia immunofluorescencyjne (IF)

3.4.1. Obróbka materiału do barwień IF

Do barwień IF, które miały określić ogólny wzór występowania PNX w zwojach DRG, wybrano po trzy pary zwojów z odcinka szyjnego (C1, C4, C7), piersiowego (Th1, Th7, Th15) i lędźwiowego (L1, L3, L6), oraz dwie pary z odcinka krzyżowego (S1, S3) rdzenia kręgowego. Zwoje DRG umieszczono parami na wstępnie schłodzonych blokach w sposób pozwalający na ustalenie położenia poszczególnych subdomen skrawków DRG pod mikroskopem, a następnie zanurzono w medium mrożeniowym (TissueTec - OCT - związku o optymalnej temperaturze cięcia). Zamrożone zwoje pocięto za pomocą mikrotomu zamrażającego HM525 Zeiss na poprzeczne, seryjne skrawki o grubości 10 µm (po cztery skrawki na każdym szkiełku).

Do barwień zostały wybrane tylko te skrawki, które zawierały wstecznie wyznakowane komórki.

3.4.2. Procedura barwień IF

3.4.2.1. Ogólna charakterystyka neurochemiczna neuronów PNX$^+$ w zwojach DRG

Skrawki mrożeniowe zwojów DRG poddano podwójnym barwieniom IF. Po wypłukaniu skrawka roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) z pozostałości medium mrożeniowego, tkankę inkubowano w roztworze blokującym przez 1 godzinę (h) w temperaturze pokojowej w celu zablokowania niespecyficznych miejsc reakcji. Barwienie skrawków mieszaniną PNX z produktem genu białkowego 9.5 (PGP 9.5) pozwoliło na określenie zarówno rozmieszczenia, jak i całkowitej liczby komórek PNX pozytywnych (PNX$^+$) w badanych zwojach DRG. Z kolei inkubacja badanych skrawków w mieszaninie PNX z przeciwciałami przeciwko: CART, CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, SOM i SP, pozwoliła na przeprowadzenie charakterystyki neurochemicznej czuciowych neuronów PNX$^+$.

Pierwotne surowice odpornościowe wizualizowano za pomocą drugorzędowych surowic odpornościowych swoistych dla króliczej (rb), szczurzej (rt), świnki morskiej (gp) i mysiej (mo) immunoglobuliny G (IgG) skoniugowanych z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) lub streptawidyną (CY3) (**Rycina 4**).

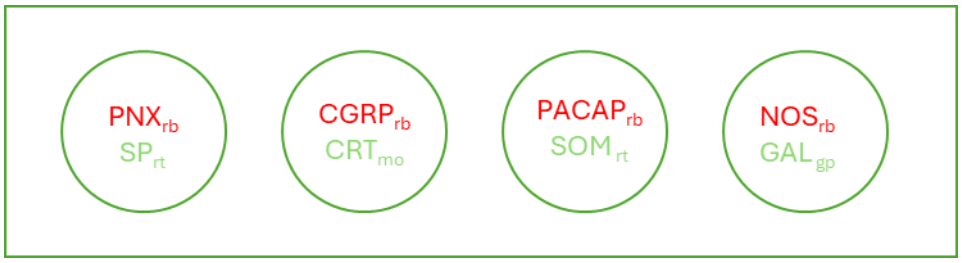


Rycina 4. Przykładowe ułożenie przeciwciał na szkiełku podstawowym; przedstawione kolory odpowiadają rzeczywistym barwom widzianym w obrazie mikroskopowym (czerwony, zielony).

Liczbę neuronów zawierających PNX i PGP 9.5 szacowano na pierwszym skrawku z sześciu szkiełek pochodzących z badanych zwojów DRG: C (C1, C4, C7), Th (Th1, Th7, Th15), L (L1, L3, L6) i S (S1, S3), natomiast współwystępowanie PNX z innymi substancjami biologicznie czynnymi w tym samym neuronie oceniano na podstawie trzech szkiełek (jeden skrawek na danym szkiełku dla każdego układu kolokalizacji; **Rycina 4**), które pochodziły z każdej jednej trzeciej części (przedniej, środkowej, tylnej; łącznie = 9 szkiełek) zwojów DRG.

3.4.2.2. Charakterystyka neurochemiczna neuronów PNX$^+$ zaopatrujacych czuciowo szyjkę macicy

Podobnie jak w procedurze opisanej powyżej, skrawki mrożeniowe zwojów DRG zawierające neurony FB$^+$ podanno procedurze podwójnych barwień IF. Po odpowiednim przygotowaniu tkanki (patrz wyżej) skrawki inkubowano w mieszaninie przeciwciał skierowanych przeciwko: CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, PNX, SOM i SP (**Rycina 5**). Pierwotne surowice odpornościowe wizualizowano za pomocą drugorzędowych surowic odpornościowych skoniugowanych z FITC lub CY3.



Rycina 5. Przykładowe ułożenie przeciwciał na szkiełku podstawowym; przedstawione kolory odpowiadają rzeczywistym barwom widzianym w obrazie mikroskopowym (czerwony, zielony).

Dzięki takiemu ułożeniu przeciwciał na szkiełku (**Rycina 5**), do określenia współwystępowania PNX z pozostałymi badanymi substancjami biologicznie czynnymi, zastosowano metodę liczenia konsekutywnego, dzięki której mogliśmy zaobserwować występowanie w jednej komórce FB$^+$ więcej niż dwóch cząsteczek transmisyjnych. Sposób liczenia skrawków polegał na analizie komórek FB$^+$ na kolejno ułożonych przekrojach tkanki, zgodnie z sekwencją ich cięcia. Ponieważ grubość skrawka wynosiła 10 µm, a

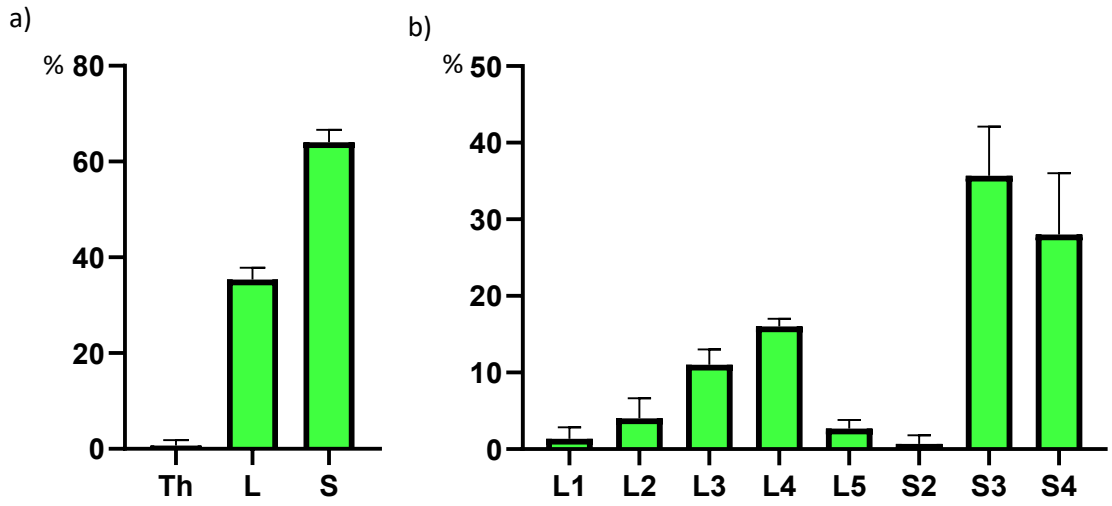
średnica małych komórek zwojowych około 40 μm, możliwe było precyzyjne określenie obecności badanych substancji w każdej komórce zwoju (małej, średniej, dużej). Analizę rozpoczynano zawsze od komórek FB^+ z widocznym jądrem komórkowym, zlokalizowanych na pierwszym skrawku, co pozwalało uniknąć podwójnego liczenia tych samych struktur.

Wszystkie wybarwione skrawki oglądano pod mikroskopem firmy Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Niemcy) wyposażonym w epifluorescencję i odpowiedni zestaw filtrów dla CY3 i FITC. Mikrofotografie wykonano aparatem cyfrowym Olympus XM10 (Tokio, Japonia), dzięki oprogramowaniu cellSens Dimension 1.7 Image Processing (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Niemcy). Wyniki analizowano statystycznie przy użyciu oprogramowania GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA). Różnice uznano za istotne przy $p < 0,05$.

4.Wyniki

4.1. Neurony FB$^+$ unerwiające szyjkę macicy

Neurony FB$^+$ zaopatrujące szyjkę macicy obserwowano w zwojach DRG na wszystkich pobranych do badań poziomach rdzenia kręgowego: Th, L oraz S (odpowiednio: 0,6 ± 0,6%, 35,3 ± 1,4%, 64,1 ± 1,5%) (**Rycina 6a**). Neurony te tworzyły dwa wyraźnie odrębne „ośrodki" nerwowe zlokalizowane obustronnie w zwojach DRG na poziomach L1-L5 („ośrodek L"; odpowiednio: 1,4 ± 0,9%, 4,6 ± 1,6%, 11,4 ± 1,1%, 15,3 ± 0,6%, 2,6 ± 0,6%) oraz S2–S4 („ośrodek S"; odpowiednio: 0,5 ± 0,7%, 35,2 ± 3,7%, 28,4 ± 4,6%) rdzenia kręgowego (**Rycina 6b**).

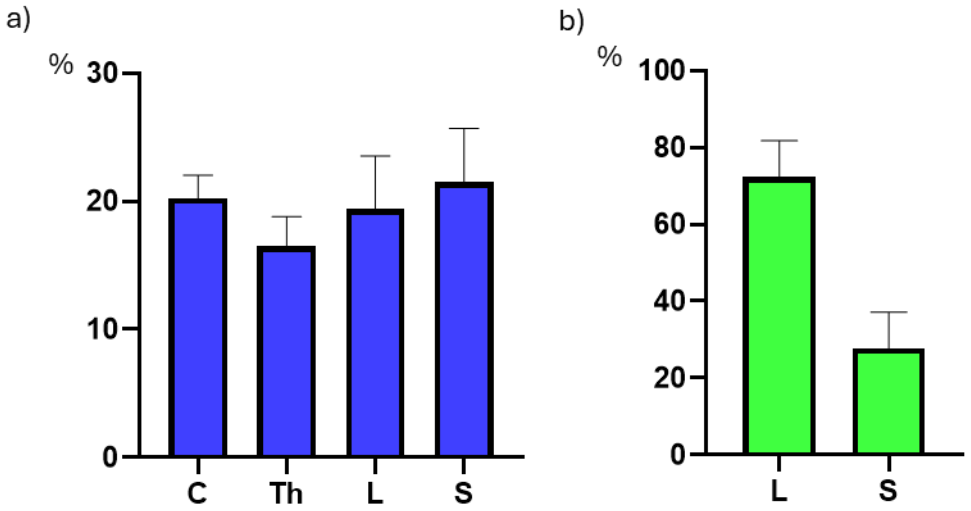


Rycina 6. Rozmieszczenie wstecznie wyznakowanych neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy w badanych zwojach rdzeniowych korzeni grzbietowych (DRG). a) Diagram słupkowy przedstawiający względne odsetki neuronów FB-pozytywnych (FB$^+$) zlokalizowanych w zwojach DRG segmentów Th, L i S rdzenia kręgowego. b) Względna częstość profili neuronalnych FB$^+$ zlokalizowanych w poszczególnych zwojach DRG na poziomach L i S rdzenia kręgowego. Uzyskane dane zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM), odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6).

4.2. Występowanie neuronów PNX$^+$ w zwojach DRG

Obecność neuronów czuciowych PNX$^+$ stwierdzono we wszystkich badanych zwojach DRG pochodzących z odcinka C (20,2 ± 1,4%), Th (16,5 ± 1,5%), L (19,4 ± 1,0%) oraz S (21,4 ± 2,5%) rdzenia kręgowego (**Rycina 7a**). Średni procentowy udział tych neuronów wynosił 19,7 ± 1,0% całkowitej liczby komórek czuciowych w analizowanych zwojach. Dodatkowo, obecność PNX w neuronach czuciowych potwierdzono badaniem spektrometrycznym wykonanym na zwojach DRG L5 pochodzących od trzech świń.

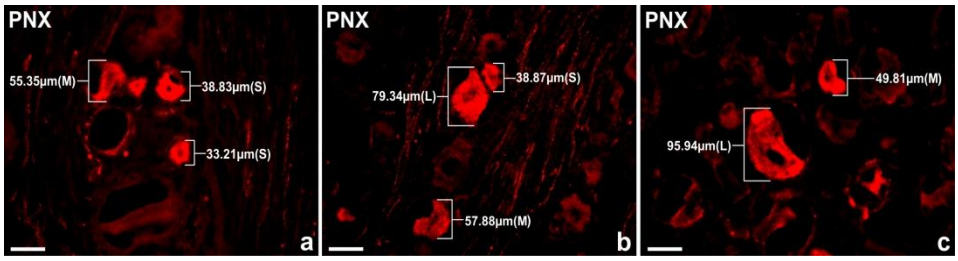
Z kolei neurony PNX$^+$ zaopatrujące czuciowo szyjkę macicy stanowiły 33,3 ± 1,7% całkowitej populacji neuronów FB$^+$ w zwojach DRG. Zdecydowana większość komórek FB$^+$/PNX$^+$ była obecna w zwojach pochodzących z poziomu L (73,4 ± 3,8%), podczas gdy w zwojach DRG pochodzących z poziomu S takie komórki występowały w znacznie mniejszej liczbie (26,6 ± 2,5%; **Rycina 7b**).



Rycina 7. Rozmieszczenie PNX w neuronach czuciowych badanych zwojów DRG. a) Ogólny diagram słupkowy przedstawiający względne odsetki neuronów czuciowych PNX$^+$ zlokalizowanych w zwojach DRG segmentów C, Th, L i S rdzenia kręgowego; uzyskane dane zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6). b) Względna częstość profili neuronalnych FB$^+$/PNX$^+$ unerwiających szyjkę macicy zlokalizowanych w zwojach DRG na poziomach L i S rdzenia kręgowego; uzyskane dane zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± SEM odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6).

4.3. Analiza morfometryczna komórek PNX$^+$

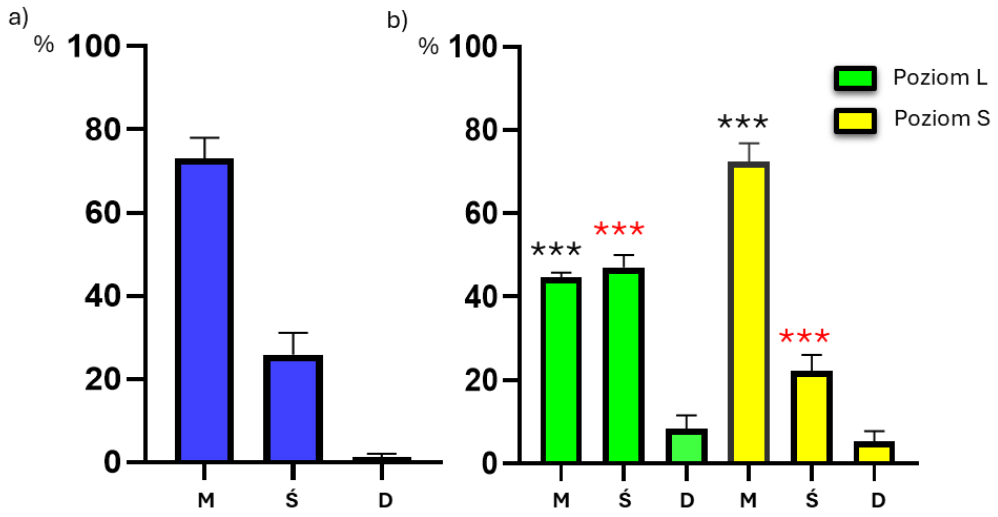
Neurony PNX$^+$ w zwojach DRG występowały w trzech rozmiarach (**Rycina 8**).



Rycina 8. Przykładowe obrazy komórek nerwowych PNX$^+$ w zwojach DRG należących do różnych klas wielkości: (a) komórki małe (33,21 µm, 38,83 µm), komórka średnia (55,35 µm); (b) komórka mała (38,87 µm), komórka średnia (57,88 µm), komórka duża (79,34 µm); (c) komórka mała (49,81 µm), komórka duża (95,94 µm). Skala: 50 µm

Zdecydowana większość neuronów czuciowych PNX$^+$ należała do komórek o małej średnicy (73,9 ± 4,7%), które przeważały liczebnie nad neuronami czuciowymi średniej wielkości (24,9 ± 4,7%), podczas gdy komórki dużych rozmiarów występowały jedynie sporadycznie (1,2 ± 0,8%) we wszystkich badanych zwojach DRG (**Rycina 9a**).

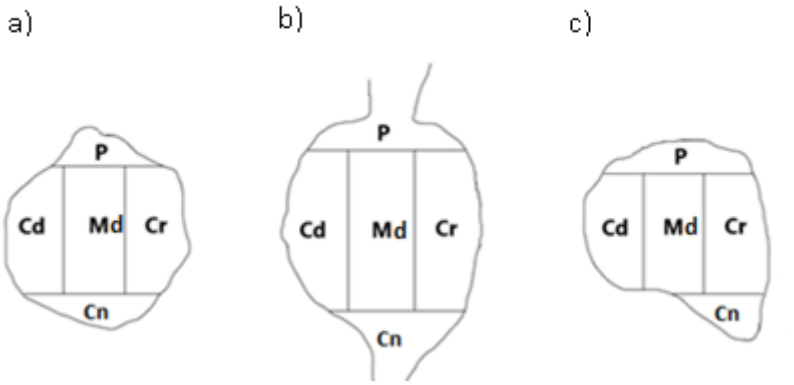
Z kolei komórki PNX$^+$ unerwiające czuciowo szyjkę macicy należały głównie do populacji neuronów małych rozmiarów (52,0 ± 1,1%). Niewiele mniejszą liczebnie grupę stanowiły komórki średniej wielkości (40,5 ± 0,7%), natomiast najrzadziej obserwowano neurony duże (7,5 ± 1,9%). Dodatkowo zaobserwowano różnice istotne statystycznie w liczebności komórek małych (44,6 ± 0,6% vs. 72,4 ± 2,5%; p = 0,0004) oraz średnich (47,0 ± 1,7% vs. 22,2 ± 2,1%; p = 0,0009) pomiędzy poziomem L oraz S (**Rycina 9b**).



Rycina 9. Względna częstość występowania PNX w neuronach małych (M), średnich (Ś) i dużych (D): a) Rozmiary komórek PNX^+ obserwowanych ogólnie w zwojach DRG; uzyskane dane zostały zebrane dla każdego zwierzęcia i przedstawione jako średnia ± SD (N = 6 zwierząt). b) Rozmiary neuronów FB^+/PNX^+ w zwojach DRG poziomów L oraz S z uwzględnieniem różnic istotnych statystycznie (*******); uzyskane dane zostały zebrane dla każdego zwierzęcia i przedstawione jako średnia ± SEM (N = 6 zwierząt).

4.4. Rozmieszczenie komórek PNX^+ w zwojach DRG

Dla zobrazowania wewnątrzzwojowego rozmieszczenia neuronów PNX^+ w DRG, na każdy analizowany fragment zwoju nałożono wzorzec dystrybucji „maskę" (**Rycina 10)**, podzielony na 5 domen: centralna (Cn), obwodowa (P), czaszkowa (Cr), ogonowa (Cd) i środkowa (Md).



Rycina 10. Schematyczny diagram przekroju zwoju DRG przedstawiający podział na domeny topograficzne, w którym badano względną częstotliwość występowania neuronów czuciowych zawierających PNX: P – domena obwodowa, Cr – domena czaszkowa, Cd – domena ogonowa, Cn – domena centralna, Md – obszar środkowy zwoju; odcinek od a) bliższej, b) środkowej i c) dalszej części zwoju.

Większość PNX^+ komórek nerwowych była zgromadzona w części Cn zwoju (28,2 ± 4,2%), podczas gdy najmniej neuronów czuciowych zawierających ten neuropeptyd zaobserwowano w domenie P (11,5 ± 4,4%). Reszta PNX^+ perikarionów była rozproszona dość równomiernie w domenach Md (21,4 ± 2,0%), Cr (19,4 ± 1,8%) i Cd (19,5 ± 1,2%) zwoju DRG.

Z kolei neurony FB^+/PNX^+ najliczniej obserwowano w domenie Cd (29,5 ± 1,7%); ponad 20% tak kodowanych komórek nerwowych była umiejscowiona w części P (21,7 ± 0,3%) oraz Cr (20,6 ± 1,3%) zwoju, natomiast najmniej neuronów PNX^+ zaopatrujących

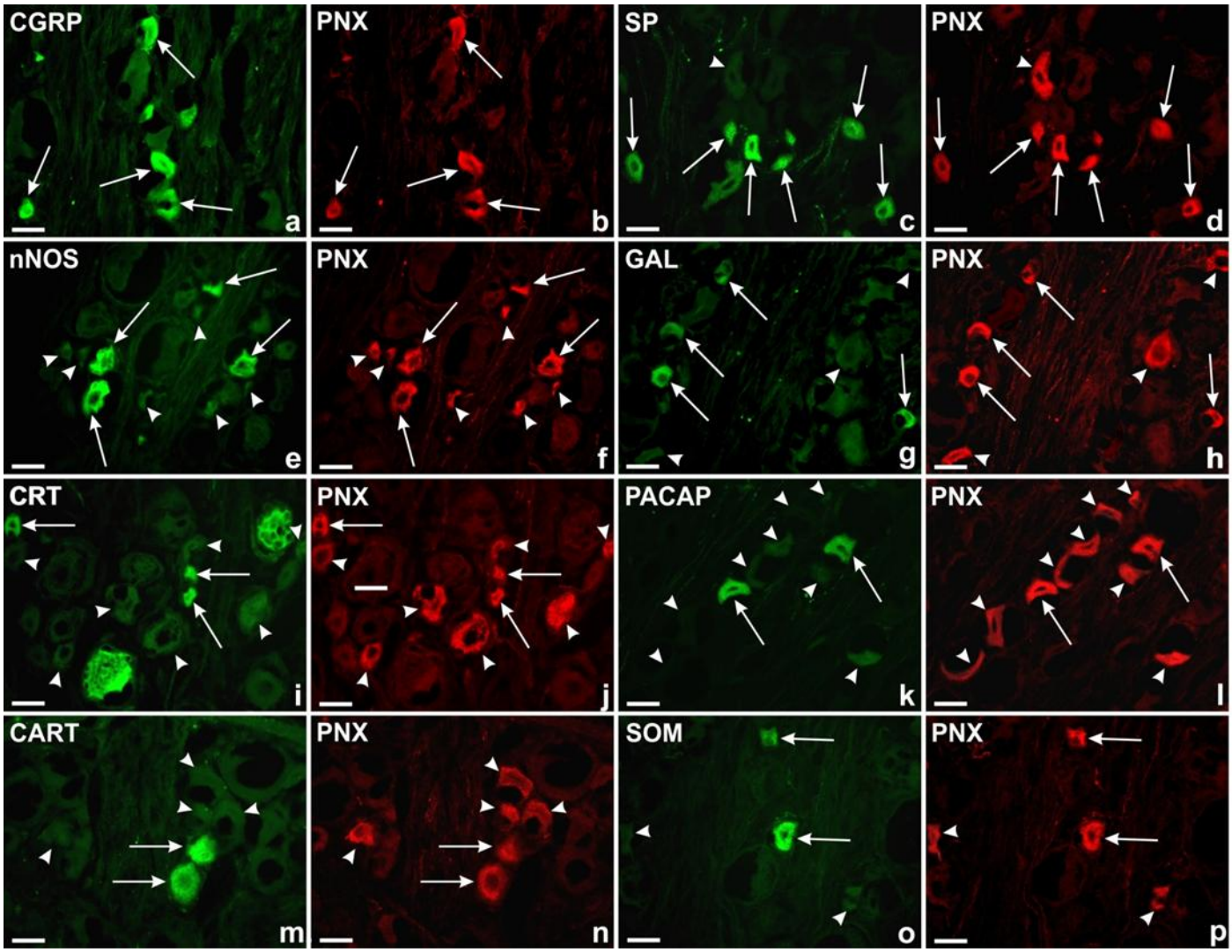
czuciowo szyjkę macicy obserwowano w domenie Md (14,2 ± 2,5%) oraz Cn (14,0 ± 2,8%). Istotne statystycznie różnice w ilości wstecznie wyznakowanych komórek PNX^+ obserwowano w domenach Cn (14,6 ± 1,8% vs. 5,5 ± 0,5%; p = 0,0030) oraz Cr (17,2 ± 0,8% vs. 33,4 ± 0,5%; p = 0,0013) pomiędzy zwojami DRG poziomów L oraz S rdzenia kręgowego.

4.5. Charakterystyka neurochemiczna neuronów PNX^+

Dzięki wykorzystaniu techniki podwójnych barwień immunohistochemicznych wykazano obecność neuronów czuciowych PNX^+ zawierających równocześnie inne substancje biologicznie czynne takie jak: CGRP, SP, nNOS, GAL, CRT, PACAP, CART i/lub SOM we wszystkich wybranych do badań zwojach DRG.

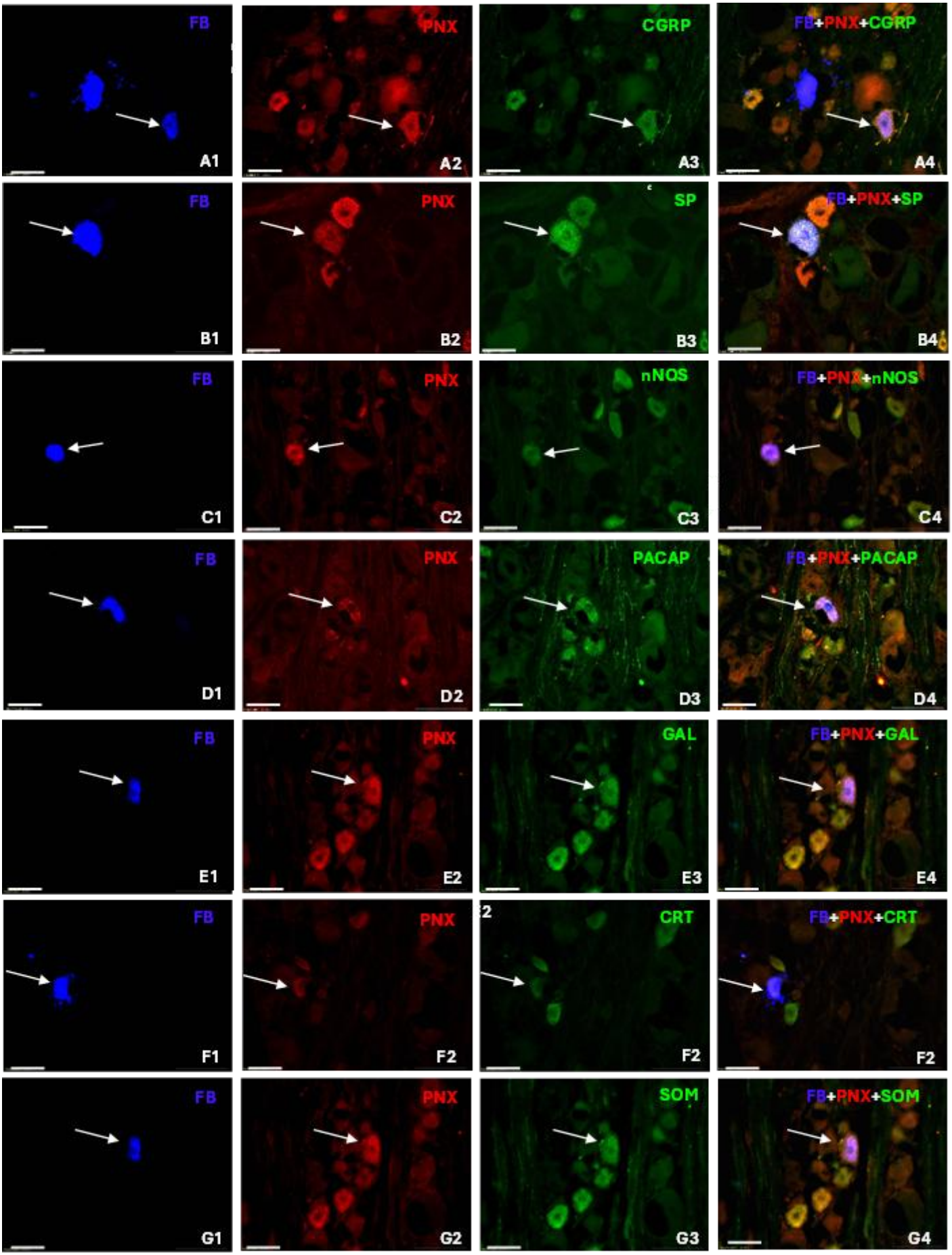
4.5.1. Kolokalizacja PNX i CGRP

Największą liczebnie grupą komórek czuciowych w zwojach DRG były neurony zawierające jednocześnie PNX i CGRP. Komórki te stanowiły 96,1 ± 0,8% (**Rycina 11; a,b**) całkowitej populacji neuronów PNX^+ zlokalizowanych we wszystkich badanych zwojach DRG, podczas gdy tylko niewielka liczba tych komórek nerwowych (3,9 ± 0,8%) nie wykazywała jednocześnie ekspresji CGRP. Neurony $PNX^+/CGRP^+$ obserwowano we wszystkich badanych zwojach DRG pobranych z segmentów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 96,9 ± 3,3%; 95,1 ± 4,0%; 96,9 ± 2,7% i 96,1 ± 3,2%).



Rycina 11. Przykładowe zdjęcia neuronów czuciowych zwojów DRG. Wszystkie zdjęcia wykonano oddzielnie z zastosowaniem filtrów w kolorze zielonym (izotiocyjanian fluoresceiny – FITC; a,c,e,g,i,k,m,o) i czerwonym (streptawidyna – CY3; b,d,f,h,j,l,n,p). Długie strzałki wskazują komórki PNX^+ (b,d,f,h,j,l,n,p), które zawierają jednocześnie: a) peptyd związany z genem kalcytoniny – CGRP, c) substancję P – SP, e) neuronalną syntazę tlenku azotu – nNOS, g) galaninę – GAL, i) kalretyninę – CRT, k) polipeptyd aktywujący cyklazę adenylanową przysadki – PACAP, m) transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą – CART, o) somatostatynę – SOM; groty strzałek wskazują komórki czuciowe PNX^+ (d,f,h,j,l,n,p), które były jednocześnie immunonegatywne w stosunku do CGRP (a), SP (c), nNOS (e), GAL (g), CRT (i), PACAP (k), CART (m), SOM (o). Odcinek skalowy — 50 μm.

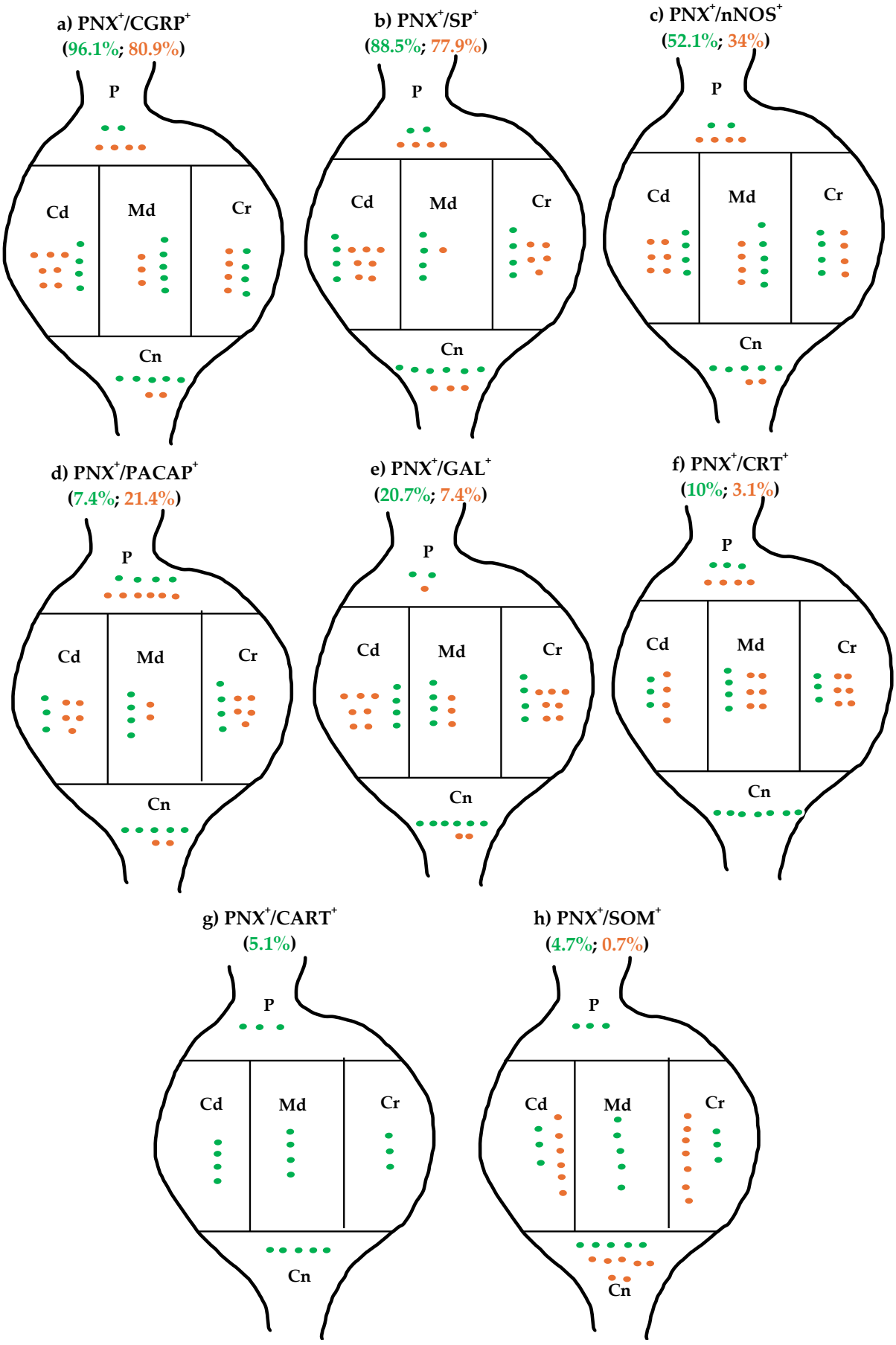
W przypadku neuronów $PNX^+/CGRP^+$ zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy, stanowiły one 80,9 ± 2,3% (**Rycina 12; A1; A2; A3; A4**) całkowitej populacji komórek nerwowych FB^+. Dodatkowo zaobserwowano znaczne różnice istotne statystycznie w liczebności tak kodowanych komórek czuciowych między zwojami DRG tworzącymi „ośrodki" L i S (odpowiednio 95,4 ± 2,0% vs. 42,3 ± 4,1%; p = 0,0003).


FB
PNX
CGRP
FB+PNX+CGRP
A1
A2
A3
A4
FB
PNX
SP
FB+PNX+SP
B1
B2
B3
B4
FB
PNX
nNOS
FB+PNX+nNOS
C1
C2
C3
C4
FB
PNX
PACAP
FB+PNX+PACAP
D1
D2
D3
D4
FB
PNX
GAL
FB+PNX+GAL
E1
E2
E3
E4
FB
PNX
2
CRT
FB+PNX+CRT
F1
F2
F2
F2
FB
PNX
SOM
FB+PNX+SOM
G1
G2
G3
G4

Rycina 12. Reprezentatywne zdjęcia komórek zwojów DRG unerwiających szyjkę macicy. Zdjęcia wykonano oddzielnie dla kanałów fluorescencyjnych: niebieskiego (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1), czerwonego (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) i zielonego (A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3). Zdjęcia A4, B4, C4, D4, E4, F4 i G4 przedstawiają obrazy, na których kanały niebieski, czerwony i zielony zostały nałożone na siebie cyfrowo. Strzałki oznaczają komórki FB^+ (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1), które zawierały równocześnie PNX (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) oraz CGRP (A3), SP (B3), nNOS (C3), PACAP (D3), GAL (E3), CRT (F3) lub SOM (G3). Odcinek skali wynosi 50 μm.

Najliczniejszą subpopulację neuronów $PNX^+/CGRP^+$ stanowiły komórki małej średnicy (69,2 ± 8,8%); neurony średniej wielkości były wyraźnie mniej liczne (29,1 ± 8,3%), natomiast duże komórki nerwowe (1,7 ± 0,5%) były rzadko obserwowane. Podobnie neurony $PNX^+/CGRP^+$ zaopatrujące czuciowo szyjkę macicy należały do trzech klas wielkości: małe (46,2 ± 5,7%), średnie (47,5 ± 6,0%) oraz duże (6,3 ± 0,3%) komórki nerwowe. Statystycznie istotne różnice w liczebności komórek średnich rozmiarów zaobserwowano między zwojami DRG L i S (52,2 ± 5,5% vs. 22,6 ± 7,6%; p = 0,0376).

Zdecydowaną większość neuronów $PNX^+/CGRP^+$ obserwowano w domenach Cn, Md, a także Cr (odpowiednio 25,3 ± 2,5%; 25,3 ± 0,7% i 20,6 ± 1,3%), podczas gdy mniejsza liczba tych komórek nerwowych obecna była w częściach Cd i P (odpowiednio 18,1 ± 1,8%, 10,7 ± 1,3%) wszystkich badanych zwojów DRG. Odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku rozmieszczenia neuronów $PNX^+/CGRP^+$ unerwiających czuciowo szyjkę macicy, gdzie największą kumulację tych komórek nerwowych odnotowano w domenach Cd oraz P (34,1 ± 2,5%; 22,3 ± 2,1%), zaś mniejsza liczebnie populacja neuronów $FB^+/PNX^+/CGRP^+$ występowała w części Cr, Md oraz Cn (odpowiednio 20,9 ± 1,6%; 14,9 ± 3,2%; 7,8 ± 1,4%) zwojów DRG (**Rycina 13a)**.


a) PNX+/CGRP+
(96.1%; 80.9%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
b) PNX+/SP+
(88.5%; 77.9%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
c) PNX+/nNOS+
(52.1%; 34%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
d) PNX+/PACAP+
(7.4%; 21.4%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
e) PNX+/GAL+
(20.7%; 7.4%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
f) PNX+/CRT+
(10%; 3.1%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
g) PNX+/CART+
(5.1%)
P
Cd
Md
Cr
Cn
h) PNX+/SOM+
(4.7%; 0.7%)
P
Cd
Md
Cr
Cn

Rycina 13. Względna częstość współwystępowania neuronów PNX^+ z różnymi neuroprzekaźnikami w poszczególnych domenach zwojowych DRG. W nawiasach: kolorem zielonym zaznaczono ogólny procent kolokalizujących neuronów PNX^+ w zwojach DRG, kolorem pomarańczowym zaznaczono procent kolokalizujących PNX^+ neuronów DRG zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy. Każda wymieniona w nawiasie pula komórek była traktowana jako 100%. Każda zielona i pomarańczowa kropka na rysunku reprezentuje około 5% populacji neuronów PNX^+.

4.5.2. Kolokalizacja PNX i SP

Drugą najliczniejszą subpopulacją neuronów czuciowych PNX^+ w badanych zwojach DRG była ta, zawierająca SP (88,5 ± 5,9%; **Rycina 11; c, d**) oraz występująca we wszystkich wybranych do badań DRG pochodzących z poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 88,8 ± 4,9%; 87,5 ± 6,5%; 87,4 ± 7,3%; 90,3 ± 4,5%).

Neurony PNX^+/SP^+ stanowiły również drugą, co do liczebności (77,9 ± 1,0%), populację wszystkich komórek czuciowych unerwiających szyjkę macicy (**Rycina 12; B1, B2, B3, B4**). Dodatkowo zaobserwowano istotne statystycznie różnice w liczebności komórek zawierających PNX i SP pomiędzy zwojami DRG tworzącymi „centra" L i S, w odniesieniu do całkowitej populacji neuronów FB^+ obserwowanych w każdym, z wymienionych poziomów rdzenia kręgowego (odpowiednio 82,7 ± 2,1% vs. 63,7 ± 5,7%; p = 0,0358).

Populacja komórek PNX^+/SP^+ składała się głównie z komórek małych (62,05 ± 6,7%), w mniejszym stopniu z komórek średnich (36,9 ± 7,1%), oraz w niewielkiej liczbie z komórek dużych (1,05 ± 0,4%). Podobnie, wśród neuronów PNX^+/SP^+ unerwiających szyjkę macicy, dominującą subpopulację stanowiły komórki małych rozmiarów (59,3 ± 3,3%), następnie neurony średniej wielkości (36,6 ± 3,4%), natomiast komórki duże występowały sporadycznie (4,1 ± 0,4%).

Większość neuronów PNX^+/SP^+ była nierównomiernie rozłożona w różnych domenach zwojów DRG. Wyraźne nagromadzenie tych komórek czuciowych stwierdzono w domenach Cn, Md, Cr i Cd (odpowiednio 27,9 ± 4,6%; 22,2 ± 6,5%; 20,1 ± 2,1% oraz 18,9 ± 7,6%). Natomiast mniejszą liczbę neuronów czuciowych PNX^+/SP^+ stwierdzono w części P (10,9 ± 1,9%) zwojów DRG. Z kolei wyraźne nagromadzenie neuronów $FB^+/PNX^+/SP^+$ obserwowano w domenach Cd, Cr i P (odpowiednio 32,5 ± 2,3%, 24,9 ± 1,8% i 20,1 ± 1,5%), zaś mniejszą liczbę tak kodowanych komórek czuciowych stwierdzono w części Cn i Md (odpowiednio 14,1 ± 2,3%; 8,0 ± 2,0%) badanych zwojów DRG **(Rycina 13 b**). Należy zauważyć, że zaobserwowano statystycznie istotne różnice w liczbie neuronów

$FB^+/PNX^+/SP^+$ pomiędzy „centrami" L i S w domenie Cr (17,8 ± 2,7% vs. 54,4 ± 6,7%; p = 0,0071).

4.5.3. Kolokalizacja PNX i nNOS

Trzecią co do wielkości subpopulację neuronów PNX^+ we wszystkich badanych zwojach DRG stanowiła ta, zawierająca nNOS (52,1 ± 11,2%; **Rycina 11; e, f**). Komórki czuciowe $PNX^+/nNOS^+$ obserwowano we wszystkich badanych zwojach DRG poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 50,1 ± 16,5%; 56,9 ± 11,6%; 49,8 ± 7,0%; 51,7 ± 9,5%).

Komórki PNX^+, zawierające nNOS oraz unerwiające szyjkę macicy, stanowiły 34,0 ± 0,9% całkowitej populacji neuronów FB^+, przy czym w zwojach DRG pochodzących z poziomu L odnotowano statystycznie istotnie większy odsetek tych komórek (42,5 ± 2,6%; **Rycina 12; C1, C2, C3, C4**) w porównaniu ze zwojami z poziomu S (13,3 ± 2,9%; p = 0,0018), w stosunku do wszystkich komórek FB^+ obserwowanych na każdym z wymienionych poziomów rdzenia kręgowego.

Pod względem średnicy wyróżniono trzy klasy neuronów $PNX^+/nNOS^+$ w badanych zwojach DRG. Najliczniejszą subpopulację stanowiły komórki średnie (52,4 ± 6,6%), nieco mniej liczne były komórki małe (46,1 ± 6,9%), podczas gdy neurony o dużej średnicy (1,5 ± 0,4%) obserwowano jedynie sporadycznie. Z kolei komórki czuciowe $PNX^+/nNOS^+$ unerwiające szyjkę macicy należały głównie do subpopulacji neuronów małych rozmiarów (56,5 ± 2,6%), komórki średnie obserwowano w mniejszej ilości (35,8 ± 3,7%), natomiast najmniej liczną grupę stanowiły komórki o dużej średnicy (7,7 ± 1,4%).

Neurony czuciowe $PNX^+/nNOS^+$ wykazywały nierównomierne rozmieszczenie wewnątrz zwojów DRG, koncentrując się głównie w domenach Md (25,6 ± 2,4%) oraz Cn (25,5 ± 1,4%). Pozostałe komórki nerwowe PNX^+ zawierające nNOS obserwowano w regionach Cr (19,7 ± 1,4%), Cd (17,3 ± 2,9%) oraz P (11,9 ± 0,9%) badanych zwojów DRG. Neurony czuciowe $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ również wykazywały nierównomierne rozmieszczenie wewnątrz zwojów, koncentrując się głównie w regionie Cd (29,8 ± 3,3%). Pozostałe komórki FB^+/PNX^+ zawierające nNOS wystepowały w domenach P, Cr, Md oraz Cn (odpowiednio 21,2 ± 4,1%, 20,1 ± 1,0%, 17,7 ± 3,6% oraz 11,2 ± 1,9%) badanych zwojów DRG **(Rycina 13 c)**. Warto podkreślić, że statystycznie istotne różnice w wewnątrzzwojowym rozmieszczeniu komórek $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ obserwowano pomiędzy głównymi ośrodkami L i S unerwiającymi szyjkę macicy w regionach Cn (12,2 ± 2,1% vs. 0,0 ± 0,0%; p = 0,0052), Cd

(28.2 ± 3,0% vs. 46,7 ± 3,3%; p = 0,0151), Cr (18,8 ± 0,6% vs. 32,7 ± 4,3%; p = 0,0337) oraz Md (19,6 ± 4,1% vs. 0,0 ± 0,0%; p = 0,0094).

4.5.4. Kolokalizacja PNX i GAL

Komórki czuciowe zawierające PNX i GAL stanowiły jedną z mniejszych subpopulacji neuronów DRG (20,7 ± 5,7%; **Rycina 11; g, h**) i były obserwowane we wszystkich badanych zwojach na poziomach C, Th, L i S rdzenia kręgowego (stanowiąc odpowiednio 16,1 ± 5,3%; 18,7 ± 7,7%; 22,8 ± 4,9%; 25,5 ± 7,0% wszystkich komórek). Z kolei komórki PNX^+/GAL^+ zaopatrujące czuciowo szyjkę macicy stanowiły 7,4 ± 1,6% (**Rycina 12; E1, E2, E3, E4**) wszystkich wstecznie wyznakowanych neuronów, zarówno w zwojach DRG na poziomie L (6,8 ± 0,9%), jak i S (8,3 ± 3,0%) rdzenia kręgowego.

Pod względem średnicy, komórki DRG PNX^+/GAL^+ należały jedynie do dwóch klas wielkości: najliczniej występującej subpopulacji komórek małych rozmiarów (99,1 ± 1,3%), oraz wyraźnie mniejszej liczebnie podgrupy komórek średniej wielkości (0,9 ± 1,3%). Neuronów PNX^+/GAL^+ o dużyej średnicy nie obserwowano w badanych zwojach DRG. W przypadku komórek nerwowych zwojów DRG zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy, wszystkie neurony $FB^+/PNX^+/GAL^+$ należały wyłącznie do subpopulacji komórek małych rozmiarów (100%).

Największą akumulację neuronów PNX^+/GAL^+ obserwowano w regionie Cn (31,9 ± 4,1%), podczas gdy najmniejszą liczebnie grupę tak kodowanych komórek czuciowych stwierdzono w domenie P (9,3 ± 1,9%) badanych zwojów DRG. Zbliżone częstości występowania neuronów PNX^+/GAL^+ zaobserwowano natomiast w regionach Md, Cr oraz Cd (odpowiednio 21,6 ± 4,4%; 18,9 ± 0,7%; 18,3 ± 1,9%). Z kolei największe skupiska komórek $FB^+/PNX^+/GAL^+$ zaobserwowano w regionach Cd (34,7 ± 2,7%) oraz Cr (34,1 ± 3,7%) badanych zwojów DRG. Pozostałe komórki tej populacji były obecne w domenach Md, Cn i P, gdzie występowały w mniejszej liczbie (odpowiednio 14,2 ± 5,4%, 11,1 ± 6,6%; 5,9 ± 3,0%; **Rycina 13e**). Warto zauważyć, że pomimo braku statystycznie istotnych różnic w liczebności neuronów PNX^+/GAL^+ zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy pomiędzy zwojami DRG poziomów L i S rdzenia kręgowego, na poziomie S kolokalizację PNX^+/GAL^+ w komórkach FB^+ zauważono tylko w częściach Cd i Cr badanych zwojów DRG.

4.5.5. Kolokalizacja PNX i CRT

Badanie kolokalizacji PNX z CRT pozwoliło na wykazanie współwystępowania tych dwóch biologicznie aktywnych substancji w niewielkiej populacji 10 ± 1,6%; **Rycina 11; i, j**) komórek czuciowych. Neurony PNX^+/CRT^+ zaobserwowano we wszystkich wybranych do badania zwojach DRG poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (stanowiąc odpowiednio 11,2 ± 1,3%; 11,2 ± 4,9%; 10,5 ± 6,0% oraz 7,3 ± 1,5% wszystkich komórek). W przypadku neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy, obecność PNX i CRT wykazano w niewielkiej liczebnie populacji (3,1 ± 1,6%) wszystkich wstecznie wyznakowanych neuronów DRG (**Rycina 12; F1, F2, F3, F4**), obserwowanych wyłącznie na poziomie L rdzenia kręgowego.

Pod względem wielkości wyróżniono trzy klasy neuronów PNX^+/CRT^+ w badanych zwojach DRG poziomów C, Th, L oraz S rdzenia kręgowego: małe (94,2 ± 6,2%), średnie (5,1 ± 6,3%) oraz duże (0,7 ± 0,8%). Podobnie w przypadku komórek czuciowych DRG zaopatrujących nerwowo szyjkę macicy, największą liczebnie populację stanowiły neurony PNX^+/CRT^+ o małej średnicy (61,3 ± 5,6%), neurony średniej wielkości występowały w mniejszej ilości (38,7 ± 5,6%), zaś nie obserwowano neuronów dużych rozmiarów.

Zdecydowana większość czuciowych komórek nerwowych zawierających PNX i CRT była obecna w domenie Cn (33,4 ± 3,8%), podczas gdy mniejsza ich liczba znajdowała się w regionach Md, Cr, Cd i P (odpowiednio 18,6 ± 8,1%; 16,7 ± 0,7%; 16,5 ± 0,7%; 14,8 ± 1,4%) badanych zwojów DRG. Z kolei neurony $FB^+/PNX^+/CRT^+$ były dość równomiernie rozłożone pomiędzy cztery domeny: Cr, Md, Cd i P (odpowiednio 27,8 ± 14,7%; 27,8 ± 14,7%; 22,2 ± 11,1%; 22,2 ± 22,2%; **Rycina 13f**).

4.5.6. Kolokalizacja PNX i PACAP

Obecność PACAP wykryto w 7,4 ± 0,8% (**Rycina 11; k, l**) populacji neuronów czuciowych zawierających PNX, obecnych we wszystkich wybranych do badania zwojach DRG poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 7,5 ± 1,8%; 6,4 ± 0,6%; 7,4 ± 2,3%; 8,6 ± 2,2%). Z kolei kolokalizację PNX oraz PACAP w komórkach FB^+ obserwowano w 21,4 ± 1,3% całkowitej populacji neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy (**Rycina 12; D1, D2, D3, D4**), zarówno na poziomie L (22,8 ± 0,7%), jak i na poziomie S (16,9 ± 3,7%).

Największą liczebnie pod względem wielkości populację neuronów $PNX^+/PACAP^+$ stanowiły komórki małych rozmiarów (87,2 ± 4,5%), rzadziej obserwowano neurony średniej

wielkości (12,1 ± 4,0%) a sporadycznie występowały komórki o dużej średnicy (0,7 ± 0,6%). Należy podkreślić, że statystycznie istotne różnice w liczebności komórek nerwowych zawierających PNX i PACAP o rozmiarach małych i średnich zaobserwowano pomiędzy poziomami C i Th (małe: 80,7 ± 7,7% vs. 94,7 ± 2,1%; $p < 0,05$; średnie: 16,6 ± 5,6% vs. 5,3 ± 2,1%; $p < 0,05$), a także Th i S (małe: 94,7 ± 2,1% vs. 83,3 ± 2,7%; $p < 0,05$; średnie: 5,3 ± 2,1% vs. 16,7 ± 2,7%; $p < 0,05$), natomiast duże neurony czuciowe $PNX^+/PACAP^+$ były obecne tylko w zwojach DRG zlokalizowanych na poziomie C rdzenia kręgowego. Z kolei komórki $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ reprezentowane były przez dwie klasy wielkości: neurony małe (61,3 ± 4,6%) oraz neurony średnich rozmiarów (38,7 ± 4,6%). Zaobserwowano także różnice statystycznie istotne w liczbie komórek małych i średnich pomiędzy badanymi poziomami L i S rdzenia kręgowego (małe: 55,8 ± 2,2% vs. 83,6 ± 4,4%; $p = 0,0051$; średnie: 44,2 ± 2,2% vs. 16,4 ± 4,4%; $p = 0,0051$).

Neurony czuciowe $PNX^+/PACAP^+$ były rozproszone wewnątrz zwojów, głównie w regionach Cn (26,5 ± 2,6%) i Md (21,0 ± 4,1%). Pozostała część komórek nerwowych PNX^+ zawierających PACAP znajdowała się w domenach P, Cr i Cd badanych zwojów DRG (odpowiednio 19,5 ± 2,2%; 18,3 ± 7,5%; 14,7 ± 5,1%). Z kolei większość neuronów FB^+/PNX^+, jednocześnie zawierających PACAP, była obserwowana w regionie P (29,2 ± 0,8%) zwoju DRG. W pozostałych domenach Cr, Cd, Cn oraz Md neurony te były mniej liczne (odpowiednio 25,5 ± 1,1%; 22,5 ± 1,2%; 12,4 ± 1,7%; 10,4 ± 2,9%; **Rycina 13 d)**. Należy podkreślić, że różnice istotne statystycznie dotyczące rozmieszczenia neuronów $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ zaobserwowano między poziomami L i S rdzenia kręgowego w domenie Cn (13,7 ± 1,5% vs. 0,0 ± 0,0%; $p = 0,0009$), P (26,6 ± 1,7% vs. 53,2 ± 7,0%; $p = 0,0217$) oraz Md (11,8 ± 3,5% vs. 0,0 ± 0,0%; $p = 0,0283$).

4.5.7. Kolokalizacja PNX i CART

Kolejną niewielką populacją neuronów PNX^+ w zwojach DRG była ta, zawierająca CART (5,1 ± 4,1%; **Rycina 11; m, n**), oraz obecna we wszystkich wybranych do badania zwojach DRG poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 5,4 ± 4,3%; 4,6 ± 3,6%; 4,9 ± 4,6%; 5,4 ± 5,0%).

Ekspresję PNX i CART obserwowano we wszystkich trzech klasach wielkości neuronów aferentnych, które stanowiły odpowiednio 55,1 ± 8,6% komórek średnich rozmiarów, 44,3 ± 8,6% komórek o małej średnicy i 0,6 ± 11,5% komórek dużych.

Ponadto tak kodowane neurony czuciowe obserwowano głównie w domenie Cn (31,9 ± 22,0%) badanych zwojów DRG. Pozostałe domeny Md, Cd, P oraz Cr zawierały odpowiednio

21,5 ± 12,1%, 18,1 ± 4,7%, 15,0 ± 6,4% oraz 13,5 ± 12,1% neuronów $PNX^+/CART^+$; **Rycina 13 g**.

4.5.8. Kolokalizacja PNX i SOM

Neurony czuciowe zawierające SOM stanowiły najmniejszą liczebnie populację (4,7 ± 2,5%; **Rycina 11; o, p**) wszystkich komórek PNX^+, obserwowaną w analizowanych zwojach DRG poziomów C, Th, L i S rdzenia kręgowego (odpowiednio 7,8 ± 6,0%; 6,3 ± 3,5%; 2,8 ± 1,5% i 2,1 ± 0,9%). Podobnie w przypadku neuronów DRG zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy, spośród wszystkich badanych neuroprzekaźników, ekspresja SOM była najrzadziej obserwowanna w komórkach czuciowych FB^+/PNX^+ (0,7 ± 0,1%; **Rycina 12; G1, G2, G3, G4**).

Najliczniejszą subpopulację komórek PNX^+/SOM^+ stanowiły komórki małych rozmiarów (85,2 ± 9,4%), wyraźnie mniej liczne były komórki średniej wielkości (14,6 ± 5,3%), podczas gdy neurony duże znajdowano sporadycznie (0,2 ± 1,1%) w badanych zwojach DRG pobranych z poziomów C, Th, L oras S rdzenia kręgowego. W przypadku komórek PNX^+/SOM^+ zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy, występowały one w dwóch rozmiarach w badanych zwojach DRG: neurony małe (66,6 ± 21,1%) oraz komórki średniej wielkości (33,4 ± 21,1%).

Wyraźne nagromadzenie komórek zawierających PNX i SOM stwierdzono w części Cn (28,2 ± 7,1%) oraz Md (24,7 ± 2,5%) badanych zwojów DRG, podczas gdy w domenach Cr, P oraz Cd, komórki te występowały w mniejszej liczbie (odpowiednio 17,0 ± 3,8%; 15,7 ± 8,1%; 14,4 ± 0,7%). W odniesieniu do wzorca rozmieszczenia wewnątrzzwojowego, większość neuronów $FB^+/PNX^+/SOM^+$ zaobserwowano w regionie Cn (50,0 ± 21,8%), nieco mniej w części Cr i Cd (odpowiednio 25,0 ± 33,3% i 25,0 ± 33,3%) badanych zwojów DRG. W pozostałych domenach DRG nie zaobserwowano tak kodowanych komórek czuciowych; **Rycina 13 h**.

4.5.9. Wzorzec wielokrotnej kolokalizacji PNX z substancjami biologicznie czynnymi w neuronach czuciowych unerwiających szyjkę macicy

Technika podwójnej immunofluorescencji, w połączeniu z konsekutywnym zliczaniem komórek FB^+/PNX^+ na seryjnych skrawkach, umożliwiła ocenę kolokalizacji więcej, niż dwóch, substancji biologicznie czynnych w obrębie tej samej komórki. Zdecydowana większość neuronów FB^+/PNX^+ (21,3%) jednocześnie zawierała CGRP i SP. Podobnie liczną populację (19,1%) stanowiły wstecznie wyznakowane komórki zawierające jednocześnie PNX, CGRP, SP oraz nNOS. W mniejszych liczebnie populacjach neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy PNX współwystepowała jednocześnie z CGRP, SP i PACAP (11,3%) oraz z CGRP, SP, PACAP i nNOS (8%). Względne udziały procentowe kolokalizacji PNX z innymi neuroprzekaźnikami w komórkach FB^+ przedstawiono w **Tabeli 1**.

.

Tabela 1. Układy kolokalizacji PNX z innymi badanymi substancjami biologicznie czynnymi w neuronach czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy.

Wzory kolokacji PNX z różnymi neuroprzekaźnikami w neuronach DRG szyjki macicy	%
FB$^+$/PNX$^+$	4.3 ± 0.7
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$	10.4 ± 4.1
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$	5.6 ± 0.8
FB$^+$/PNX$^+$/PACAP$^+$	0.2 ± 0.2
FB$^+$/PNX$^+$/GAL$^+$	0.2 ± 0.2
FB$^+$/PNX$^+$/CRT$^+$	0.6 ± 0.6
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/NOS$^+$	5.1 ± 1.5
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/PACAP$^+$	1.5 ± 0.2
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/GAL$^+$	0.2 ± 0.2
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/CRT$^+$	0.3 ± 0.3
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$	21.3 ± 3.8
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$	0.3 ± 0.1
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/NOS$^+$	0.7 ± 0.3
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/GAL$^+$	0.9 ± 0.8
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/CRT$^+$	0.8 ± 0.5
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/SOM$^+$	0.3 ± 0.3
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$	11.3 ± 2.2
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/CRT$^+$	0.3 ± 0.3
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP+/SP$^+$/SOM$^+$	0.3 ± 1.1
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/GAL$^+$	3.2 ± 1.2
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/NOS$^+$	19.1 ± 3.3
FB$^+$/PNX$^+$/PACAP$^+$/GAL$^+$	0.5 ± 0.0
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/PACAP$^+$/NOS$^+$	1.0 ± 0.1
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$/NOS$^+$	0.2 ± 0.2
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$/GAL$^+$	0.8 ± 0.8
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$/NOS$^+$	8.0 ± 0.8
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$/GAL$^+$	0.4 ± 0.3
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/NOS$^+$/GAL$^+$	0.3 ± 0.1
FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/CRT$^+$/PACAP$^+$	0.4 ± 0.4
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/PACAP$^+$/CRT$^+$/NOS$^+$/GAL$^+$	0.2 ± 0.1
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/CGRP$^+$/CRT$^+$/PACAP$^+$/NOS$^+$	0.4 ± 0.0
FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$/CGRP$^+$/CRT$^+$/PACAP$^+$/GAL$^+$	0.9 ± 0.0

5. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz analizy uzyskanych wyników możliwe było sformułowanie następujących wniosków:

1. PNX obecna była w neuronach czuciowych zwojów DRG na każdym z wybranych do badań poziomie rdzenia kręgowego (C, Th, L, S), bez wyraźnych różnic w liczebności populacji komórek zawierających ten neuropeptyd. PNX jest kolejną, z całej gamy neurotransmiterów, substancją biologicznie czynną, która zaangażowana jest w procesy związane z transmisją sensoryczną. Równomierne występowanie PNX w zwojach czuciowych poszczególnych poziomów rdzenia kręgowego pokazuje jej wielokierunkowy, możliwy udział w modulacji lub przekazywaniu transmisji czuciowej z wielu narządów i tkanek organizmu.
2. Około 30% populacji neuronów zwojów DRG zaopatrujących szyjkę macicy zawierała PNX, co może świadczyć o jej dużym zaangażowaniu w procesy transmisji czuciowej pochodzącej z tego narządu.
3. Analiza morfometryczna wykazała, że PNX jest obecna w heterogennej, pod względem wielkości perykarionu, populacji neuronów czuciowych, także tych zaopatrujących szyjkę macicy. Ekspresja PNX w komórkach małych, średnich oraz dużych znacznie utrudnia przypisanie temu peptydowi specyficznej roli w przetwarzaniu poszczególnych modalności sensorycznych. Niemniej jednak, jako że zdecydowaną większość populacji neuronów PNX^+ stanowiły komórki o małej średnicy (do 40 μm), wydaje się prawdopodobne, że neurony te funkcjonalnie związane są przede wszystkim z przewodzeniem bodźców bólowych oraz termicznych.
4. Badanie wewnątrzzwojowego rozmieszczenia neuronów zawierających PNX wykazało ich obecność we wszystkich częściach zwoju, z niewielką liczebnie przewagą komórek PNX^+ w części Cn. W przypadku neuronów PNX^+ unerwiających czuciowo szyjkę macicy, większość tak kodowanych komórek nerwowych obserwowano w domenie Cd zwoju DRG.
5. Zarówno wstecznie wyznakowane neurony czuciowe z terenu szyjki macicy (FB^+/PNX^+), jak i pozostałe komórki zwojów DRG eksprymujące PNX, wykazywały obecność każdej, z wybranych do badania, substancji biologicznie czynnych. Najczęściej obserwowano współwystępowanie PNX z CGRP lub SP (których zasadniczą funkcją jest udział w przewodzeniu bodźców bólowych), oraz z nNOS

odpowiedzialną za modulację transmisji czuciowej. Jednakże, odsetek komórek FB^+/PNX^+ zawierających CGRP, SP lub nNOS różnił się znacząco w zależności od poziomu rdzenia kręgowego. Podczas gdy, na poziomie L, takie kolokalizacje obserwowano u znacznej populacji neuronów PNX^+, na poziomie S były one istotnie niższe. Tak wyraźna różnica może sugerować funkcjonalną heterogenność populacji neuronów $FB^+/PNX^+/CGRP^+$, $FB^+/PNX^+/SP^+$, $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ unerwiających szyjkę macicy. Wyższy odsetek tak kodowanych komórek na poziomie L może wskazywać, że najprawdopodobniej odgrywają one istotną rolę w transmisji i przetwarzaniu bodźców nocyceptywnych.

6. Analiza współwystępowania PNX z różnymi neurotransmiterami w tej samej komórce FB^+ wykazała, że substancja ta najczęściej kolokalizowała jednocześnie z CGRP, SP oraz nNOS, co potwierdza jej znaczące uczestnictwo w procesach związanych z przekazywaniem, i/lub modulacją transmisji bólowej z terenu szyjki macicy.

6. Literatura

Ahlawat, A., Rana, A., Goyal, N., & Sharma, S. (2014). Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, *22*(5), 269–278. https://doi.org/10.1007/S10787-014-0213-0

Akdu, S., Can, U., & Polat, E. (2022). Investigation of serum phoenixin levels in patients with hypertension. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, *68*(6), 814. https://doi.org/10.1590/1806-9282.20220153

Al Moghrabi, H., Elkeilani, A., Thomas, J. M., & Mai, K. T. (2007). Calretinin: An immunohistochemical marker for the normal functional endometrial stroma and alterations of the immunoreactivity in dysfunctional uterine bleeding. *Pathology - Research and Practice*, *203*(2), 79–83. https://doi.org/10.1016/J.PRP.2006.10.005

Ambrus, A., Kraftsik, R., & Barakat-Walter, I. (1998). Ontogeny of calretinin expression in rat dorsal root ganglia. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *106*(1–2), 101–108. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00201-0

Balkan, B., Gozen, O., Koylu, E. O., Keser, A., Kuhar, M. J., & Pogun, S. (2012). Region- and sex-specific changes in CART mRNA in rat hypothalamic nuclei induced by forced swim stress. *Brain Research*, *1479*, 62–71. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.08.043

Battaglia, G., & Rustioni, A. (1988). Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, *277*(2), 302–312. https://doi.org/10.1002/CNE.902770210

Billert, M., Kołodziejski, P. A., Strowski, M. Z., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2019). Phoenixin-14 stimulates proliferation and insulin secretion in insulin producing INS-1E cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, *1866*(12). https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2019.118533

Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–15. https://doi.org/10.3390/IJMS21218378

Boissel, J. P., Schwarz, P. M., & Förstermann, U. (1998). Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, *2*(5), 337–349. https://doi.org/10.1006/NIOX.1998.0189

Bombardi, C., Grandis, A., Nenzi, A., Giurisato, M., & Cozzi, B. (2010). Immunohistochemical Localization of Substance P And Cholecystokinin in the Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord of the Bottlenose Dolphin (Tursiops truncatus). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *293*(3), 477–484. https://doi.org/10.1002/AR.20975

Bossowska, A., Crayton, R., Radziszewski, P., Kmiec, Z., & Majewski, M. (2009). Distribution and neurochemical characterization of sensory dorsal root ganglia neurons supplying porcine urinary bladder. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *60 Suppl 4*, 77–81. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20083855/

Bossowska, A., & Majewski, M. (2012). Tetrodotoxin induced changes in the chemical coding of dorsal root ganglion neurons supplying the porcine urinary bladder. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *15*(2), 355–363. https://doi.org/10.2478/V10181-012-0054-Y

Brain, S. D., Tippins, J. R., Morris, H. R., MacIntyre, I., & Williams, T. J. (1986). Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *87*(4), 533–536. https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12455620

Bredt, D. S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, *31*(6), 577–596. https://doi.org/10.1080/10715769900301161

Broberger, C., Holmberg, K., Kuhar, M. J., & Hökfelt, T. (1999). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13506–13511. https://doi.org/10.1073/PNAS.96.23.13506

Buhimschi, I., Ali, M., Jain, V., Chwalisz, K., & Garfield, R. E. (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *11*(8), 1755–1766. https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A019481

Bulc, M., Całka, J., Meller, K., & Jana, B. (2019). Endometritis affects chemical coding of the dorsal root ganglia neurons supplying uterus in the sexually mature gilts. *Research in Veterinary Science*, *124*, 417–425. https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2019.05.003

Can, U., Akdu, S., & Şahinoğlu, S. (2024). The Levels of Phoenixin-14 and Phoenixin-20 in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, *24*. https://doi.org/10.2174/0118715303267256231210060250

Carlton, S. M., Du, J., Davidson, E., Zhou, S., & Coggeshall, R. E. (2001). Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain*, *90*(3), 233–244. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00407-3

Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, *115*, 29–41. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00003-5

Chapman, V., & Dickenson, A. H. (1992). The effects of sandostatin and somatostatin on nociceptive transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuropeptides*, *23*(3), 147–152. https://doi.org/10.1016/0143-4179(92)90115-D

Chwalisz, K., Shao-Qing, S., Garfield, R. E., & Beier, H. M. (1997). Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *12*(10), 2093–2101. https://doi.org/10.1093/HUMREP/12.10.2093

Çimenli, S., Kale, İ., & Muhcu, M. (2022). Investigation of Serum Phoenixin-14 Concentration in Pregnant Women Diagnosed with Hyperemesis Gravidarum. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Neonatologie*, *227*(5), 347–353. https://doi.org/10.1055/A-2073-8652/ID/R12-2022-0688-0020/BIB

Collins, J. J., Usip, S., McCarson, K. E., & Papka, R. E. (2002). Sensory nerves and neuropeptides in uterine cervical ripening. *Peptides*, *23*(1), 167–183. https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00593-9

Corness, J., Shi, T. J., Xu, Z. Q., Brulet, P., & Hökfelt, T. (1996). Influence of leukemia inhibitory factor on galanin/GMAP and neuropeptide Y expression in mouse primary sensory neurons after axotomy. *Experimental Brain Research*, *112*(1), 79–88. https://doi.org/10.1007/BF00227180

Cowan, A., Lyu, R. M., Chen, Y. H., Dun, S. L., Chang, J. K., & Dun, N. J. (2015). Phoenixin: A candidate pruritogen in the mouse. *Neuroscience*, *310*, 541–548. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.055

Dalsgaard, C. J., Hökfelt, T., Johansson, O., & Elde, R. (1981). Somatostatin immunoreactive cell bodies in the dorsal horn and the parasympathetic intermediolateral nucleus of the rat spinal cord. *Neuroscience Letters*, *27*(3), 335–339. https://doi.org/10.1016/0304-3940(81)90453-5

Damaj, M. I., Hunter, R. G., Martin, B. R., & Kuhar, M. J. (2004). Intrathecal CART (55-102) enhances the spinal analgesic actions of morphine in mice. *Brain Research*, *1024*(1–2), 146–149. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.07.058

Damaj, M., Zheng, J., Martin, B. R., & Kuhar, M. J. (2006). Intrathecal CART (55-102) attenuates hyperlagesia and allodynia in a mouse model of neuropathic but not inflammatory pain. *Peptides*, *27*(8), 2019–2023. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.09.019

Danuser, H., Springer, J. P., Katofiasc, M. A., & Thor, K. B. (1997). Extrinsic Innervation of the Cat Prostate Gland: A Combined Tracing and Immunohistochemical Study. *Journal of Urology*, *157*(3), 1018–1024. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65134-6

Douglass, J., McKinzie, A. A., & Couceyro, P. (1995). PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(3 Pt 2), 2471–2481. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02471.1995

Dray, A. (1996). Chapter 6 Neurogenic mechanisms and neuropeptides in chronic pain. *Progress in Brain Research*, *110*, 85–94. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62566-2

Dun, E. C., Huang, R. L., Dun, S. L., & Dun, N. J. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Research*, *721*(1–2), 233–237. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00139-4

Dylag, T., Kotlinska, J., Rafalski, P., Pachuta, A., & Silberring, J. (2006). The activity of CART peptide fragments. *Peptides*, *27*(8), 1926–1933. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.10.025

Eftekhari, S., & Edvinsson, L. (2010). Possible sites of action of the new calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *3*(6), 369. https://doi.org/10.1177/1756285610388343

Esposito, M. F., Malayil, R., Hanes, M., & Deer, T. (2019). Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Medicine (Malden, Mass.)*, *20*(Suppl 1), S23–S30. https://doi.org/10.1093/PM/PNZ012

Fiallos-Estrada, C. E., Kummer, W., Mayer, B., Bravo, R., Zimmermann, M., & Herdegen, T. (1993). Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neuroscience Letters*, *150*(2), 169–173. https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90528-S

Fricker, L. D. (2012). *Neuropeptides and other bioactive peptides : from discovery to function*. 109. https://books.google.com/books/about/Neuropeptides_and_Other_Bioactive_Peptid.html?hl=pl&id=OM2YVKfnQGMC

Friedrich, T., Schalla, M. A., Scharner, S., Kühne, S. G., Goebel-Stengel, M., Kobelt, P., Rose, M., & Stengel, A. (2019). Intracerebroventricular injection of phoenixin alters feeding behavior and activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in rats. *Brain Research*, *1715*, 188–195. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2019.03.034

Garry, M. G., & Hargreaves, K. M. (1992). Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Research*, *582*(1), 139–142. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90328-7

Garry, M. G., Miller, K. E., & Seybold, V. S. (1989). Lumbar dorsal root ganglia of the cat: a quantitative study of peptide immunoreactivity and cell size. *The Journal of Comparative Neurology*, *284*(1), 36–47. https://doi.org/10.1002/CNE.902840104

Gasparini, S., Stein, L. M., Loewen, S. P., Haddock, C. J., Soo, J., Ferguson, A. V., Kolar, G. R., Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2018). Novel regulator of vasopressin secretion: phoenixin. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *314*(4), R623. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00426.2017

Gautam, M., Prasoon, P., Kumar, R., Reeta, K. H., Kaler, S., & Ray, S. B. (2016). Role of neurokinin type 1 receptor in nociception at the periphery and the spinal level in the rat. *Spinal Cord*, *54*(3), 172–182. https://doi.org/10.1038/SC.2015.206

Gibson, S. J., Polak, J. M., Bloom, S. R., Sabate, I. M., Mulderry, P. M., Ghatei, M. A., Mcgregor, G. P., Morrison, J. F. B., Kelly, J. S., Evans, R. M., & Rosenfeldl, M. G. (1984). Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *The Journal of Neuroscience*, *4*(12), 3101–3111. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-12-03101.1984

Gołyszny, M., Obuchowicz, E., & Zieliński, M. (2022). Neuropeptides as regulators of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis activity and their putative roles in stress-induced fertility disorders. *Neuropeptides*, *91*. https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2021.102216

Gonkowski, S. (2014). Somatostatin-like immunoreactive primary sensory neurons supplying the porcine adrenal glands in physiological conditions and after adrenalectomy. *Journal of Veterinary Research*, *58*(4), 651–656. https://doi.org/10.2478/BVIP-2014-0099

Goswami, S. C., Mishra, S. K., Maric, D., Kaszas, K., Gonnella, G. L., Clokie, S. J., Kominsky, H. D., Gross, J. R., Keller, J. M., Mannes, A. J., Hoon, M. A., & Iadarola, M. J. (2014). Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-Seq transcriptome analysis: RNA-Seq of the TRPV1 lineage nociceptome. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, *15*(12), 1338. https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2014.09.010

Guvenc, G., Altinbas, B., Kasikci, E., Ozyurt, E., Bas, A., Udum, D., Niaz, N., & Yalcin, M. (2019). Contingent role of phoenixin and nesfatin-1 on secretions of the male reproductive hormones. *Andrologia*, *51*(11), e13410. https://doi.org/10.1111/AND.13410

Haberberger, R. V., Barry, C., Dominguez, N., & Matusica, D. (2019). Human dorsal root ganglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 465353. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00271/XML

Haddock, C. J., Almeida-Pereira, G., Stein, L. M., Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2020). Fluid and Electrolyte Homeostasis: A novel regulator of thirst behavior: phoenixin. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *318*(6), R1027. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00023.2020

Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(3), 457–476. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2004.09.001

Henken, D. B., & Martin, J. R. (1992). Herpes simplex virus infection induces a selective increase in the proportion of galanin-positive neurons in mouse sensory ganglia. *Experimental Neurology*, *118*(2), 195–203. https://doi.org/10.1016/0014-4886(92)90036-P

Hökfelt, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M., & Melander, T. (1987). Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neuroscience Letters*, *83*(3), 217–220. https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90088-7

Holmes, F. E., Bacon, A., Pope, R. J. P., Vanderplank, P. A., Kerr, N. C. H., Sukumaran, M., Pachnis, V., & Wynick, D. (2003). Transgenic overexpression of galanin in the dorsal root ganglia modulates pain-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(10), 6180. https://doi.org/10.1073/PNAS.0937087100

Hoyer, D., & Bartfai, T. (2012). Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. *Chemistry & Biodiversity*, *9*(11), 2367–2387. https://doi.org/10.1002/CBDV.201200288

Hu, P., & McLachlan, E. M. (2001). Long-term changes in the distribution of galanin in dorsal root ganglia after sciatic or spinal nerve transection in rats. *Neuroscience*, *103*(4), 1059–1071. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00025-2

Huang, J., Polgár, E., Solinski, H. J., Mishra, S. K., Tseng, P. Y., Iwagaki, N., Boyle, K. A., Dickie, A. C., Kriegbaum, M. C., Wildner, H., Zeilhofer, H. U., Watanabe, M., Riddell, J. S., Todd, A. J., & Hoon, M. A. (2018). Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nature Neuroscience 2018 21:5*, *21*(5), 707–716. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0119-z

Ichikawa, H., Jacobowitz, D. M., & Sugimoto, T. (1993). Calretinin-immunoreactive neurons in the trigeminal and dorsal root ganglia of the rat. *Brain Research*, *617*(1), 96–102. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90618-W

Ichikawa, H., Jin, H. W., Terayama, R., Yamaai, T., Jacobowitz, D. M., & Sugimoto, T. (2005). Calretinin-containing neurons which co-express parvalbumin and calbindin D-

28k in the rat spinal and cranial sensory ganglia; triple immunofluorescence study. *Brain Research*, *1061*(2), 118–123. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.08.014

Iyengar, S., Johnson, K. W., Ossipov, M. H., & Aurora, S. K. (2019). CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache*, *59*(5), 659–681. https://doi.org/10.1111/HEAD.13529

Iyengar, S., Ossipov, M. H., & Johnson, K. W. (2017). *The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine*. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000831

Jana, B., Całka, J., & Miciński, B. (2021). Regulatory influence of galanin and galr1/galr2 receptors on inflamed uterus contractility in pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6415. https://doi.org/10.3390/IJMS22126415/S1

Jana, B., Całka, J., & Witek, K. (2022). Investigation of the Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) and Its Type 1 (PAC1) Receptor in Uterine Contractility during Endometritis in Pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10). https://doi.org/10.3390/IJMS23105467

Janikiewicz, P., Mazur, U., Holak, P., Karakina, N., Węglarz, K., Majewski, M. K., & Bossowska, A. (2025). Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Urinary Bladder. *Cells*, *14*(7), 516. https://doi.org/10.3390/CELLS14070516

Janikiewicz, P., Wasilewska, B., Mazur, U., Franke-Radowiecka, A., Majewski, M., & Bossowska, A. (2021). The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24). https://doi.org/10.3390/IJMS222413399

Javed, H., Rehmathulla, S., Tariq, S., Ali, M. A., Emerald, B. S., & Shehab, S. (2021). Co-localization of nociceptive markers in the lumbar dorsal root ganglion and spinal cord of dromedary camel. *Journal of Comparative Neurology*, *529*(17), 3710–3725. https://doi.org/10.1002/CNE.25240

Jiang, J. H., He, Z., Peng, Y. L., Jin, W. D., Mu, J., Xue, H. X., Wang, Z., Chang, M., & Wang, R. (2015). Effects of Phoenixin-14 on anxiolytic-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, *286*, 39–48. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.011

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(6852), 203–210. https://doi.org/10.1038/35093019

Kalamon, N., Błaszczyk, K., Szlaga, A., Billert, M., Skrzypski, M., Pawlicki, P., Górowska – Wójtowicz, E., Kotula – Balak, M., Błasiak, A., & Rak, A. (2020). Levels of the neuropeptide phoenixin-14 and its receptor GRP173 in the hypothalamus, ovary and periovarian adipose tissue in rat model of polycystic ovary syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *528*(4), 628–635. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.05.101

Kardon, A. P., Polgár, E., Hachisuka, J., Snyder, L. M., Cameron, D., Savage, S., Cai, X., Karnup, S., Fan, C. R., Hemenway, G. M., Bernard, C. S., Schwartz, E. S., Nagase, H., Schwarzer, C., Watanabe, M., Furuta, T., Kaneko, T., Koerber, H. R., Todd, A. J., & Ross, S. E. (2014). Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuron*, *82*(3), 573–586. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.02.046

Kashiba, H., Ueda, Y., & Senba, E. (1996). Coexpression of preprotachykinin-A, alpha-calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, *70*(1), 179–189. https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00334-F

Kirby, L. S., Kirby, M. A., Warren, J. W., Tran, L. T., & Yellon, S. M. (2005). Increased innervation and ripening of the prepartum murine cervix. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *12*(8), 578–585. https://doi.org/10.1016/J.JSGI.2005.08.006

Kozsurek, M., Lukácsi, E., Fekete, C., Wittmann, G., Réthelyi, M., & Puskár, Z. (2007). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(6), 1624–1631. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05789.X

Kuhar, M. J., & Dall Vechia, S. E. (1999). CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends in Neurosciences*, *22*(7), 316–320. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01377-0

Kulinska, K. I., Andrusiewicz, M., Dera-Szymanowska, A., Billert, M., Skrzypski, M., Szymanowski, K., Nowak-Markwitz, E., Kotwicka, M., & Wołuń-Cholewa, M. (2021). Phoenixin as a New Target in the Development of Strategies for Endometriosis

Diagnosis and Treatment. *Biomedicines*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9101427

Kulinska, K. I., Białas, P., Dera-Szymanowska, A., Billert, M., Kotwicka, M., Szymanowski, K., & Wołun-Cholewa, M. (2023). The role of phoenixin in the proliferation and migration of ectopic epithelial cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *646*, 44–49. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2023.01.056

Kumar, R., Gautam, M., Prasoon, P., Gupta, S., & Ray, S. B. (2018). Comparison of the peripheral antinociceptive effect of somatostatin with bupivacaine and morphine in the rodent postoperative pain model. *European Journal of Anaesthesiology*, *35*(12), 955–965. https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000825

Landry, M., Åman, K., Dostrovsky, J., Lozano, A. M., Carlstedt, T., Spenger, C., Josephson, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., & Hökfelt, T. (2003). Galanin expression in adult human dorsal root ganglion neurons: Initial observations. *Neuroscience*, *117*(4), 795–809. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00965-X

Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., Hökfelt, T., & Kofler, B. (2015). Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacological Reviews*, *67*(1), 118–175. https://doi.org/10.1124/PR.112.006536

Larmet, Y., Dolphin, A. C., & Davies, A. M. (1992). Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent on neurotrophic factors. *Neuron*, *9*(3), 563–574. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90193-H

Lawson, S. N. (2005). The Peripheral Sensory Nervous System: Dorsal Root Ganglion Neurons. *Peripheral Neuropathy: 2-Volume Set with Expert Consult Basic*, 163–202. https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9491-7.50011-9

Lawson, S. N., Crepps, B. A., & Perl, E. R. (1997). Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *Journal of Physiology*, 177–191.

Ledingham, M. A., Thomson, A. J., Young, A., Macara, L. M., Greer, I. A., & Norman, J. E. (2000). Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Molecular Human Reproduction*, *6*(11), 1041–1048. https://doi.org/10.1093/MOLEHR/6.11.1041

Lepiarczyk, E., Bossowska, A., Majewska, M., Skowrońska, A., Kaleczyc, J., & Majewski, M. (2020). Distribution and chemical coding of phoenixin-immunoreactive nerve structures in the spinal cord of the pig. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, *232*. https://doi.org/10.1016/J.AANAT.2020.151559

Lepiarczyk, E., Majewski, M., & Bossowska, A. (2015). The influence of intravesical administration of resiniferatoxin (RTX) on the chemical coding of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine urinary bladder. *Histochemistry and Cell Biology*, *144*(5), 479–489. https://doi.org/10.1007/S00418-015-1355-X

Lin, Y. T., & Chen, J. C. (2018). Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *2018*(140), 57569. https://doi.org/10.3791/57569

Lioudyno, M., Skoglösa, Y., Takei, N., & Lindholm, D. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro. *Journal of Neuroscience Research*. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980115)51:2

Liu, T. T., Wei, S., Jin, Y., Qiu, C. Y., & Hu, W. P. (2021). Inhibition of ASIC-Mediated Currents by Activation of Somatostatin 2 Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Molecular Neurobiology*, *58*(5), 2107–2117. https://doi.org/10.1007/S12035-020-02257-X

Liu, Y., Yuan, Z., He, H., Liu, H., Wu, Y., Xue, S., Diao, Z., & Qiao, H. (2025). TTX-R and TTX-S Sodium Channels in CGRP-Positive Dorsal Root Ganglia Neurons Mediate Referred Somatic Hyperalgesia in Ulcerative Colitis Mice. *Neurogastroenterology and Motility*, *37*(9). https://doi.org/10.1111/NMO.70051

Luo, Y., Zhu, Y., Basang, W., Wang, X., Li, C., & Zhou, X. (2021). Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.752410

Lyu, R. M., Huang, X. F., Zhang, Y., Dun, S. L., Luo, J. J., Chang, J. K., & Dun, N. J. (2013). Phoenixin: a novel peptide in rodent sensory ganglia. *Neuroscience*, *250*, 622. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.07.057

Ma, W., & Bisby, M. A. (1997). Differential expression of galanin immunoreactivities in the primary sensory neurons following partial and complete sciatic nerve injuries. *Neuroscience*, *79*(4), 1183–1195. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00088-2

Maniglier, M., Vidal, M., Bachelin, C., Deboux, C., Chazot, J., Garcia-Diaz, B., & Baron-Van Evercooren, A. (2022). Satellite glia of the adult dorsal root ganglia harbor stem cells that yield glia under physiological conditions and neurons in response to injury. *Stem Cell Reports*, *17*(11), 2467–2483. https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2022.10.002

McIlwraith, E. K., Zhang, N., & Belsham, D. D. (2022). The Regulation of Phoenixin: A Fascinating Multidimensional Peptide. *Journal of the Endocrine Society*, *6*(2), bvab192. https://doi.org/10.1210/jendso/bvab192

Melander, T., Hökfelt, T., & Rökaeus, A. (1986). Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *248*(4), 475–517. https://doi.org/10.1002/CNE.902480404

Mlyczyńska, E., Kurowska, P., Wachowska, D., Grzesiak, M., Dupont, J., & Rak, A. (2024). Phoenixin-14 as a novel direct regulator of porcine luteal cell functions. *Biology of Reproduction*, *110*(1), 154. https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAD138

Mollenholt, P., Rawal, N., Gordh, T., & Olsson, Y. (1994). Intrathecal and epidural somatostatin for patients with cancer. Analgesic effects and postmortem neuropathologic investigations of spinal cord and nerve roots. *Anesthesiology*, *81*(3), 534–542. https://doi.org/10.1097/00000542-199409000-00004

Moraes, E. R. icardo, Kushmerick, C., & Naves, L. A. raujo. (2014). Characteristics of dorsal root ganglia neurons sensitive to Substance P. *Molecular Pain*, *10*, 73. https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-73/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186_1744-8069-10-73-FIG5.JPEG

Mowa, C. N., & Papka, R. E. (2004). The Role of Sensory Neurons in Cervical Ripening: Effects of Estrogen and Neuropeptides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *52*(10), 1249–1258. https://doi.org/10.1177/002215540405201001

Mowa, C. N., Usip, S., Collins, J., Storey-Workley, M., Hargreaves, K. M., & Papka, R. E. (2003). The effects of pregnancy and estrogen on the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the uterine cervix, dorsal root ganglia and spinal cord. *Peptides*, *24*(8), 1163–1174. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2003.07.009

Muddhrry, P. K., Ghatki, M. A., Spokks, R. A., Jonhs, P. M., Pierson, A. M., Hamid, Q. A., Kanse, S., Amara, S. G., Burrik, J. M., Legon, S., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1988). Differential expression of α-CGRP and β-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*, *25*(1), 195–205. https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90018-8

Nahin, R. L., Ren, K., De León, M., & Ruda, M. (1994). Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, *58*(1), 95–108. https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90189-9

Nguyen, X. P., Nakamura, T., Osuka, S., Bayasula, B., Nakanishi, N., Kasahara, Y., Muraoka, A., Hayashi, S., Nagai, T., Murase, T., Goto, M., Iwase, A., & Kikkawa, F. (2019). Effect of the neuropeptide phoenixin and its receptor GPR173 during folliculogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*, *158*(1), 25–34. https://doi.org/10.1530/REP-19-0025

Ninomiya, T., Vuillemin, M., Walter-Barakat, I., Winking, H., Pexieder, T., & Droz, B. (1993). Mouse fetal trisomy 13 and hypotrophy of the spinal cord: Effect on calbindin-D28k and calretinin expressed by neurons of the spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience*, *57*(4), 1109–1120. https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90053-I

Noguchi, K., Senba, E., Morita, Y., Sato, M., & Tohyama, M. (1990). Co-expression of α-CGRP and β-CGRP mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells. *Neuroscience Letters*, *108*(1–2), 1–5. https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90696-7

Ohsawa, M., Dun, S. L., Tseng, L. F., Chang, J. K., & Dun, N. J. (2000). Decrease of hindpaw withdrawal latency by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide to the mouse spinal cord. *European Journal of Pharmacology*, *399*(2–3), 165–169. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00374-5

Olesen, J., & Edvinsson, L. (1991). Migraine: a research field matured for the basic neurosciences. *Trends in Neurosciences*, *14*(1), 3–5. https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90171-P

Orentas, R. J., Sindiri, S., Duris, C., Wen, X., He, J., Wei, J. S., Jarzembowski, J., & Khan, J. (2017). Paired expression analysis of tumor cell surface antigens. *Frontiers in Oncology*, *7*(AUG), 173. https://doi.org/10.3389/FONC.2017.00173/FULL

Pałasz, A., Rojczyk, E., Bogus, K., Worthington, J. J., & Wiaderkiewicz, R. (2015). The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, *592*, 17–21. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.02.060

Pałasz, A., Tyszkiewicz-Nwafor, M., Suszka-Świtek, A., Bacopoulou, F., Dmitrzak-Węglarz, M., Dutkiewicz, A., Słopień, A., Janas-Kozik, M., Wilczyński, K. M., Filipczyk, Ł., Bogus, K., Rojczyk, E., Paszyńska, E., & Wiaderkiewicz, R. (2021). Longitudinal study on novel neuropeptides phoenixin, spexin and kisspeptin in adolescent inpatients with anorexia nervosa – association with psychiatric symptoms. *Nutritional Neuroscience*, *24*(11), 896–906. https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1692494

Papka, R. E., Collins, J., Copelin, T., & Wilson, K. (1999). Calretinin-immunoreactive nerves in the uterus, pelvic autonomic ganglia, lumbosacral dorsal root ganglia and lumbosacral spinal cord. *Cell and Tissue Research*, *298*(1), 63–74. https://doi.org/10.1007/S004419900071

Papka, R. E., Cotton, J. P., & Traurig, H. H. (1985). Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell and Tissue Research*, *242*(3), 475–490. https://doi.org/10.1007/BF00225412

Papka, R. E., Newton, B. W., & McNeill, D. L. (1991). Origin of galanin-immunoreactive nerve fibers in the rat paracervical autonomic ganglia and uterine cervix. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *33*(1), 25–33. https://doi.org/10.1016/0165-1838(91)90015-U

Papka, R. E., & Traurig, H. H. (1989). Galanin-immunoreactive nerves in the female rat paracervical ganglion and uterine cervix: distribution and reaction to capsaicin. *Cell and Tissue Research*, *257*(1), 41–51. https://doi.org/10.1007/BF00221632/METRICS

Papka, R. E., Workley, M., Usip, S., Mowa, C. N., & Fahrenkrug, J. (2006). Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in the uterine cervix, lumbosacral dorsal root ganglia and spinal cord of rats during pregnancy. *Peptides*, *27*(4), 743–752. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.08.005

Philippe, E., & Droz, B. (1989). Calbindin-immunoreactive sensory neurons of dorsal root ganglion project to skeletal muscle in the chick. *The Journal of Comparative Neurology*, *283*(1), 153–160. https://doi.org/10.1002/CNE.902830113

Pittaluga, A., Roggeri, A., Vallarino, G., & Olivero, G. (2021). Somatostatin, a Presynaptic Modulator of Glutamatergic Signal in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11). https://doi.org/10.3390/IJMS22115864

Prasoon, P., Kumar, R., Gautam, M., Sebastian, E. K., Reeta, K. H., & Ray, S. B. (2015). Role of Somatostatin and Somatostatin Receptor type 2 in Postincisional Nociception in Rats. *Neuropeptides*, *49*, 47–54. https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2014.12.002

Prinz, P., Scharner, S., Friedrich, T., Schalla, M., Goebel-Stengel, M., Rose, M., & Stengel, A. (2017). Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(1), 195–201. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.09.048

Rajaei, S., Zendehdel, M., Rahnema, M., Hassanpour, S., & Asle-Rousta, M. (2022). Mediatory role of the central NPY, melanocortine and corticotrophin systems on phoenixin-14 induced hyperphagia in neonatal chicken. *General and Comparative Endocrinology*, *315*, 113930. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2021.113930

Rees, T. A., Tasma, Z., Garelja, M. L., O'Carroll, S. J., Walker, C. S., & Hay, D. L. (2024). Calcitonin receptor, calcitonin gene-related peptide and amylin distribution in C1/2 dorsal root ganglia. *The Journal of Headache and Pain*, *25*(1), 36. https://doi.org/10.1186/S10194-024-01744-Z

Reichlin, S. (1983). Somatostatin. *The New England Journal of Medicine*, *309*(24), 1495–1501. https://doi.org/10.1056/NEJM198312153092406

Ren, K., Ruda, M. A., & Jacobowitz, D. M. (1993). Immunohistochemical localization of calretinin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Research Bulletin*, *31*(1–2), 13–22. https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90004-U

Ribeiro-da-Silva, A., & Hökfelt, T. (2000). Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides*, *34*(5), 256–271. https://doi.org/10.1054/NPEP.2000.0834

Rocca, C., Scavello, F., Granieri, M. C., Pasqua, T., Amodio, N., Imbrogno, S., Gattuso, A., Mazza, R., Cerra, M. C., & Angelone, T. (2018). Phoenixin-14: detection and novel

physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *75*(4), 743–756. https://doi.org/10.1007/S00018-017-2661-3

Rogers, J. H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *The Journal of Cell Biology*, *105*(3), 1343–1353. https://doi.org/10.1083/JCB.105.3.1343

Rorsman, P., & Huising, M. O. (2018). The somatostatin-secreting pancreatic δ-cell in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, *14*(7), 404–414. https://doi.org/10.1038/S41574-018-0020-6

Rosenfeld, M. G., Mermod, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W., & Evans, R. M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, *304*(5922), 129–135. https://doi.org/10.1038/304129A0

Russell, F. A., King, R., Smillie, S. J., Kodji, X., & Brain, S. D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1099–1142. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00034.2013

Russo, A. F. (2015). Calcitonin gene-related peptide (CGRP): A new target for migraine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *55*(Volume 55, 2015), 533–552. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124701/CITE/REFWORKS

Rybska, M., Billert, M., Skrzypski, M., Kubiak, M., Woźna-Wysocka, M., Łukomska, A., Nowak, T., Błaszczyk-Cichoszewska, J., Pomorska-Mól, M., & Wąsowska, B. (2022). Canine cystic endometrial hyperplasia and pyometra may downregulate neuropeptide phoenixin and GPR173 receptor expression. *Animal Reproduction Science*, *238*, 106931. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2022.106931

Saria, A. (1984). Substance P in sensory nerve fibres contributes to the development of oedema in the rat hind paw after thermal injury. *British Journal of Pharmacology*, *82*(1), 217–222. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1984.TB16461.X

Schalla, M. A., & Stengel, A. (2018). Phoenixin-A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6). https://doi.org/10.3390/IJMS19061726

Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., Rose, M., & Stengel, A. (2017). Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, *96*, 53–60. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2017.08.004

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature 2000 404:6778*, *404*(6778), 661–671. https://doi.org/10.1038/35007534

Shi, T. J. S., Xiang, Q., Zhang, M. D., Barde, S., Kai-Larsen, Y., Fried, K., Josephson, A., Glück, L., Deyev, S. M., Zvyagin, A. V., Schulz, S., & Hökfelt, T. (2014). Somatostatin and its 2A receptor in dorsal root ganglia and dorsal horn of mouse and human: Expression, trafficking and possible role in pain. *Molecular Pain*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-12/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186_1744-8069-10-12-FIG10.JPEG

Shiers, S., Klein, R. M., & Price, T. J. (2020). Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain*, *161*(10), 2410–2424. https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001973

Sicuteri, F., Geppetti, P., Marabini, S., & Lembeck, F. (1984). Pain relief by somatostatin in attacks of cluster headache. *Pain*, *18*(4), 359–365. https://doi.org/10.1016/0304-3959(84)90048-4

Simavli, S., Thompson, I. R., Maguire, C. A., Gill, J. C., Carroll, R. S., Wolfe, A., Kaiser, U. B., & Navarro, V. M. (2015). Substance P Regulates Puberty Onset and Fertility in the Female Mouse. *Endocrinology*, *156*(6), 2313–2322. https://doi.org/10.1210/EN.2014-2012

Simões, A. L. B., Silva, G. A. R., Giorgetto, C., de Cassia do Carmo-Campos, E., Dias, F. J., & Fazan, V. P. S. (2018). Substance P in Dorsal Root Ganglion Neurons in Young and Adult Rats, after Nociceptive Stimulation during the Neonatal Period. *Anatomical Record*, *301*(5), 849–861. https://doi.org/10.1002/AR.23755

Skofitsch, G., & Jacobowitz, D. M. (1985). Galanin-like immunoreactivity in capsaicin sensitive sensory neurons and ganglia. *Brain Research Bulletin*, *15*(2), 191–195. https://doi.org/10.1016/0361-9230(85)90135-2

Stantcheva, K. K., Iovino, L., Dhandapani, R., Martinez, C., Castaldi, L., Nocchi, L., Perlas, E., Portulano, C., Pesaresi, M., Shirlekar, K. S., De Castro Reis, F., Paparountas, T., Bilbao, D., & Heppenstall, P. A. (2016). A subpopulation of itch-sensing neurons marked by Ret and somatostatin expression. *EMBO Reports*, *17*(4), 585–600. https://doi.org/10.15252/EMBR.201540983

Stein, L. M., Tullock, C. W., Mathews, S. K., Garcia-Galiano, D., Elias, C. F., Samson, W. K., & Yosten, G. L. C. (2016). Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor Gpr173. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *311*(3), R489–R496. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00191.2016

Steinert, J. R., Chernova, T., & Forsythe, I. D. (2010). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *16*(4), 435–452. https://doi.org/10.1177/1073858410366481

Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., & Bunnett, N. W. (2014). Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiological Reviews*, *94*(1), 265–301. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00031.2013

Sun, G., Ren, Q., Bai, L., & Zhang, L. (2020). Phoenixin-20 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in dental pulp cells. *Chemico-Biological Interactions*, *318*. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2020.108971

Tatemoto, K., Rökaeus, Å., Jörnvall, H., McDonald, T. J., & Mutt, V. (1983). Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Letters*, *164*(1), 124–128. https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80033-7

Tepper, Stewart J, Neurology, G., & Tepper, S J. (2018). History and Review of anti-Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Therapies: From Translational Research to Treatment. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, *58*, 238–275. https://doi.org/10.1111/HEAD.13379

Toossi, A., Bergin, B., Marefatallah, M., Parhizi, B., Tyreman, N., Everaert, D. G., Rezaei, S., Seres, P., Gatenby, J. C., Perlmutter, S. I., & Mushahwar, V. K. (2021). Comparative neuroanatomy of the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, pig, monkey, and human. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81371-9

Toth, D., Szabo, E., Tamas, A., Juhasz, T., Horvath, G., Fabian, E., Opper, B., Szabo, D., Maugeri, G., D'Amico, A. G., D'Agata, V., Vicena, V., & Reglodi, D. (2020). Protective Effects of PACAP in Peripheral Organs. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00377

Traub, R. J., Allen, B., Humphrey, E., & Ruda, M. A. (1990). Analysis of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the cat dorsal spinal cord and dorsal root ganglia provide evidence for a multisegmental projection of nociceptive C-fiber primary afferents. *The Journal of Comparative Neurology*, *302*(3), 562–574. https://doi.org/10.1002/CNE.903020312

Traurig, H., Saria, A., & Lembeck, F. (1984). Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *326*(4), 343–346. https://doi.org/10.1007/BF00501440

Treen, A. K., Luo, V., & Belsham, D. D. (2016). Phoenixin Activates Immortalized GnRH and Kisspeptin Neurons Through the Novel Receptor GPR173. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *30*(8), 872–888. https://doi.org/10.1210/ME.2016-1039

Ullah, K., ur Rahman, T., Wu, D. D., Lin, X. H., Liu, Y., Guo, X. Y., Leung, P. C. K., Zhang, R. J., Huang, H. F., & Sheng, J. Z. (2017). Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Clinica Chimica Acta*, *471*, 243–247. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2017.06.013

Van Son, M., Lopes, M. S., Martell, H. J., Derks, M. F. L., Gangsei, L. E., Kongsro, J., Wass, M. N., Grindflek, E. H., & Harlizius, B. (2019). A QTL for Number of Teats Shows Breed Specific Effects on Number of Vertebrae in Pigs: Bridging the Gap Between Molecular and Quantitative Genetics. *Frontiers in Genetics*, *10*(MAR). https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00272

Vaudry, David, Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T. F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., & Gonzalez, B. J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(9), 6398. https://doi.org/10.1073/PNAS.082112699

Wang, M., Deng, S. P., Chen, H. P., Jiang, D. neng, Tian, C. X., Yang, W., Wu, T. li, Zhu, C. H., Zhang, Y., & Li, G. L. (2018). Phoenixin participated in regulation of food intake and

growth in spotted scat, Scatophagus argus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *226*, 36–44. https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2018.07.007

Wasowicz, K., Majewski, M., & Łakomy, M. (1998). Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *74*(1), 13–22. https://doi.org/10.1016/S0165-1838(98)00112-X

Wei, X., Lin, H., Zhang, B., Li, M., Chen, Y., Huang, Y., Zhang, J., Yang, Y., Guo, Z., Li, W., Ye, L., & Lin, R. (2021). Phoenixin-20 Prevents ox-LDL-Induced Attachment of Monocytes to Human Aortic Endothelial Cells (HAECs): A Protective Implication in Atherosclerosis. *ACS Chemical Neuroscience*, *12*(6), 990–997. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00787

Xiang, Q., Tao, J. sheng, Li, J. J., Tian, R. B., & Li, X. H. (2022). Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in mouse pinch nerve injury model: Modulation by Somatostatin type-2 receptor. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *121*. https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2022.102086

Xu, X., Yang, X., Zhang, P., Chen, X., Liu, H., & Li, Z. (2012). Effects of exogenous galanin on neuropathic pain state and change of galanin and its receptors in DRG and SDH after sciatic nerve-pinch injury in rat. *PloS One*, *7*(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037621

Yang, S. C., Shieh, K. R., & Li, H. Y. (2005). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*, *133*(3), 841–851. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.03.023

Yosten, G. L. C., Harada, C. M., Haddock, C., Giancotti, L. A., Kolar, G. R., Patel, R., Guo, C., Chen, Z., Zhang, J., Doyle, T. M., Dickenson, A. H., Samson, W. K., & Salvemini, D. (2020). GPR160 de-orphanization reveals critical roles in neuropathic pain in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2587–2592. https://doi.org/10.1172/JCI133270

Yosten, G. L. C., Lyu, R. M., Hsueh, A. J. W., Avsian-Kretchmer, O., Chang, J. K., Tullock, C. W., Dun, S. L., Dun, N., & Samson, W. K. (2013). A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of Neuroendocrinology*, *25*(2), 206. https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2012.02381.X

Yuruyen, M., Gultekin, G., Batun, G. C., Yavuzer, H., Akcan, F. E., Doventas, A., & Emul, M. (2017). Does plasma phoenixin level associate with cognition? Comparison between subjective memory complaint, mild cognitive impairment, and mild Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*, *29*(9), 1543–1550. https://doi.org/10.1017/S1041610217000825

Zacharko-Siembida, A., Kulik, P., Szalak, R., Lalak, R., & Arciszewski, M. B. (2014). Co-expression patterns of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) with neuropeptides in dorsal root ganglia of the pig. *Acta Histochemica*, *116*(2), 390–398. https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2013.09.006

Zhang, Q., Shi, T. J., Ji, R. R., Zhang, Y. then, Sundler, F., Hannibal, J., Fahrenkrug, J., & Hökfelt, T. (1995). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in dorsal root ganglia following axotomy: time course and coexistence. *Brain Research*, *705*(1–2), 149–158. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01150-1

Zhang, X., Ju, G., Elde, R., & Hökfelt, T. (1993). Effect of peripheral nerve cut on neuropeptides in dorsal root ganglia and the spinal cord of monkey with special reference to galanin. *Journal of Neurocytology*, *22*(5), 342–381. https://doi.org/10.1007/BF01195558

Zhang, Xu, Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Bredt, D., Snyder, S. H., & Hökfelt, T. (1993). Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *The Journal of Comparative Neurology*, *335*(4), 563–575. https://doi.org/10.1002/CNE.903350408

Zhang, Y.-Z., Hannibal, J., Zhao, Q., Moller, K., Danielsen, N., Fahrenkrug, J., & Sundler, F. (1996). Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, *74*(4), 1099–1110. https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00168-6

Zhou, L., & Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, *20*(4), 223–230. https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2009.03.001

Zieglgänsberger, W. (2019). Substance P and pain chronicity. *Cell and Tissue Research*, *375*(1), 227–241. https://doi.org/10.1007/S00441-018-2922-Y

Znaor, L., Lovrić, S., Hogan, Q., & Sapunar, D. (2007). Association of Neural Inflammation with Hyperalgesia Following Spinal Nerve Ligation. *Croatian Medical Journal*, *48*(1), 35. /pmc/articles/PMC2080501/

7.Spis rycin oraz tabel

Rycina 1. Sekwencja aminokwasowa peptydu prekursorowego feniksyny – Smim20 i jej dwóch głównych izoform: feniksyny-20 i feniksyny-14 (PNX). Źródło: Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–15. https://doi.org/10.3390/IJMS21218378..... 10

Rycina 2. Potencjalne skutki terapeutyczne PNX – wpływ patologii (czerwone strzałki) na funkcje fizjologiczne (pole niebieskie) i powiązane możliwe skutki terapeutyczne PNX (zielone strzałki). Źródło: Friedrich, T. i Stengel, A. (2023). Current state of phoenixin—the implications of the pleiotropic peptide in stress and its potential as a therapeutic target. Frontiers in Pharmacology, 14. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1076800..... 18

Rycina 3. Schematyczny rysunek przedstawiający neurony DRG (kolor niebieski) z włóknem aferentnym biegnącym na obwód, oraz włóknem centralnym przekazującym informacje do ośrodkowego układu nerwowego (CUN). Źródło: https://szkolaanatomii.pl/2018/09/06/prokuracja-w-wenecji-i-nerwy-rdzeniowe-co-je-laczy/. 19

Rycina 4. Przykładowe ułożenie przeciwciał na szkiełku podstawowym; przedstawione kolory odpowiadają rzeczywistym barwom widzianym w obrazie mikroskopowym (czerwony, zielony). 33

Rycina 5. Przykładowe ułożenie przeciwciał na szkiełku podstawowym; przedstawione kolory odpowiadają rzeczywistym barwom widzianym w obrazie mikroskopowym (czerwony, zielony). 34

Rycina 6. Rozmieszczenie wstecznie wyznakowanych neuronów czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy w badanych zwojach rdzeniowych korzeni grzbietowych (DRG). a) Diagram słupkowy przedstawiający względne odsetki neuronów FB-pozytywnych (FB^+) zlokalizowanych w zwojach DRG segmentów Th, L i S rdzenia kręgowego. b) Względna częstość profili neuronalnych FB^+ zlokalizowanych w poszczególnych zwojach DRG na poziomach L i S rdzenia kręgowego. Uzyskane dane zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM), odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6)..... 36

Rycina 7. Rozmieszczenie PNX w neuronach czuciowych badanych zwojów DRG. a) Ogólny diagram słupkowy przedstawiający względne odsetki neuronów czuciowych PNX^+ zlokalizowanych w zwojach DRG segmentów C, Th, L i S rdzenia kręgowego; uzyskane dane

zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6). b) Względna częstość profili neuronalnych FB^+/PNX^+ unerwiających szyjkę macicy zlokalizowanych w zwojach DRG na poziomach L i S rdzenia kręgowego; uzyskane dane zostały zebrane dla wszystkich zwierząt i przedstawione jako średnia ± SEM odnosząca się do liczby zwierząt (N = 6). 37

Rycina 8. Przykładowe obrazy komórek nerwowych PNX^+ w zwojach DRG należących do różnych klas wielkości: (a) komórki małe (33,21 μm, 38,83 μm), komórka średnia (55,35 μm); (b) komórka mała (38,87 μm), komórka średnia (57,88 μm), komórka duża (79,34 μm); (c) komórka mała (49,81 μm), komórka duża (95,94 μm). Skala: 50 μm..... 38

Rycina 9. Względna częstość występowania PNX w neuronach małych (M), średnich (Ś) i dużych (D): a) Rozmiary komórek PNX^+ obserwowanych ogólnie w zwojach DRG; uzyskane dane zostały zebrane dla każdego zwierzęcia i przedstawione jako średnia ± SD (N = 6 zwierząt). b) Rozmiary neuronów FB^+/PNX^+ w zwojach DRG poziomów L oraz S z uwzględnieniem różnic istotnych statystycznie (*******); uzyskane dane zostały zebrane dla każdego zwierzęcia i przedstawione jako średnia ± SEM (N = 6 zwierząt). 39

Rycina 10. Schematyczny diagram przekroju zwoju DRG przedstawiający podział na domeny topograficzne, w którym badano względną częstotliwość występowania neuronów czuciowych zawierających PNX: P – domena obwodowa, Cr – domena czaszkowa, Cd – domena ogonowa, Cn – domena centralna, Md – obszar środkowy zwoju; odcinek od a) bliższej, b) środkowej i c) dalszej części zwoju. 39

Rycina 11. Przykładowe zdjęcia neuronów czuciowych zwojów DRG. Wszystkie zdjęcia wykonano oddzielnie z zastosowaniem filtrów w kolorze zielonym (izotiocyjanian fluoresceiny – FITC; a,c,e,g,i,k,m,o) i czerwonym (streptawidyna – CY3; b,d,f,h,j,l,n,p). Długie strzałki wskazują komórki PNX^+ (b,d,f,h,j,l,n,p), które zawierają jednocześnie: a) peptyd związany z genem kalcytoniny – CGRP, c) substancję P – SP, e) neuronalną syntazę tlenku azotu – nNOS, g) galaninę – GAL, i) kalretyninę – CRT, k) polipeptyd aktywujący cyklazę adenylanową przysadki – PACAP, m) transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą – CART, o) somatostatynę – SOM; groty strzałek wskazują komórki czuciowe PNX^+ (d,f,h,j,l,n,p), które były jednocześnie immunonegatywne w stosunku do CGRP (a), SP (c), nNOS (e), GAL (g), CRT (i), PACAP (k), CART (m), SOM (o). Odcinek skalowy — 50 μm. 41

Rycina 12. Reprezentatywne zdjęcia komórek zwojów DRG unerwiających szyjkę macicy. Zdjęcia wykonano oddzielnie dla kanałów fluorescencyjnych: niebieskiego (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1), czerwonego (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) i zielonego (A3, B3, C3, D3, E3, F3,

G3). Zdjęcia A4, B4, C4, D4, E4, F4 i G4 przedstawiają obrazy, na których kanały niebieski, czerwony i zielony zostały nałożone na siebie cyfrowo. Strzałki oznaczają komórki FB^+ (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1), które zawierały równocześnie PNX (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2) oraz CGRP (A3), SP (B3), nNOS (C3), PACAP (D3), GAL (E3), CRT (F3) lub SOM (G3). Odcinek skali wynosi 50 μm. 43

Rycina 13. Względna częstość współwystępowania neuronów PNX^+ z różnymi neuroprzekaźnikami w poszczególnych domenach zwojowych DRG. W nawiasach: kolorem zielonym zaznaczono ogólny procent kolokalizujących neuronów PNX^+ w zwojach DRG, kolorem pomarańczowym zaznaczono procent kolokalizujących PNX^+ neuronów DRG zaopatrujących czuciowo szyjkę macicy. Każda wymieniona w nawiasie pula komórek była traktowana jako 100%. Każda zielona i pomarańczowa kropka na rysunku reprezentuje około 5% populacji neuronów PNX^+. 45

Tabela 1. Układy kolokalizacji PNX z innymi badanymi substancjami biologicznie czynnymi w neuronach czuciowych zaopatrujących szyjkę macicy..... 51

BIBLIOTEKA UNIWERSYTECKA
UWM W OLSZTYNIE

Olsztyn, 11.02.2026

Mgr Urszula Mazur

Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka,
Wydział Lekarski,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego autorstwa mgr Urszuli Mazur przygotowana na podstawie danych z bazy: Bibliografia publikacji pracowników Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Analiza cytowań:

Lp.	Rok	Tytuł publikacji	Liczba cytowań w bazie Web of Science Core Collecion	Liczba cytowań w bazie Scopus
1	2025	**Tytuł oryginału:** *RAGE signaling pathway in inflammatory andvascular pathology of diabetic retinopathy: implications for interventional strategies* **Czasopismo: Acta Neurobiologiae Experimentalis**	--	--
2	2025	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Urinary Bladder* **Czasopismo: Cells**	--	--
3	2025	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix* **Czasopismo: Cells**	--	--
4	2023	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	2	2

5	2021	**Tytuł oryginału:** *The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	6	6
6	2021	**Tytuł oryginału:** *The influence of an adrenergic antagonist guanethidine on the distribution pattern and chemical coding of caudal mesenteric ganglion perikarya and their axons supplying the porcine bladder* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	1	1
7	2021	**Tytuł oryginału:** *Somatostatin immunoreactivity within the urinary bladder nerve fibers and paracervical ganglion urinary bladder projecting neurons in the female pig* **Czasopismo: Journal of Chemical Neuroanatomy**	3	5
8	2015	**Tytuł oryginału:** *Botulinum toxin type A induces changes in the chemical coding of substance P-immunoreactive dorsal root ganglia sensory neurons supplying the porcine urinary bladder* **Czasopismo: Toxins**	12	20
		suma cytowań:	**24**	**34**

Podsumowanie cytowań:

- Raport cytowań przeprowadzony w bazie **Web of Science Core Collection** w dniu 11.02.2026

  • ilość prac cytowanych - 5
  • ilość cytowań - 24
  • indeks Hirscha h = 3

- Raport cytowań przeprowadzony w bazie **Scopus** w dniu 11.02.2026

  • ilość prac cytowanych - 5
  • ilość cytowań - 34
  • indeks Hirscha h = 3

Punktacja:

- **Publikacje w czasopismach zagranicznych:**

Lp.	Rok	Tytuł publikacji	Punkty MNiSW	Impact Factor
1	2025	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Urinary Bladder* **Czasopismo: Cells**	140	5.200
2	2025	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix* **Czasopismo: Cells**	140	5.200
3	2023	**Tytuł oryginału:** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	140	4.900
4	2021	**Tytuł oryginału:** *The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	140	6.208
5	2021	**Tytuł oryginału:** *The influence of an adrenergic antagonist guanethidine on the distribution pattern and chemical coding of caudal mesenteric ganglion perikarya and their axons supplying the porcine bladder* **Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences**	140	6.208
6	2021	**Tytuł oryginału:** *Somatostatin immunoreactivity within the urinary bladder nerve fibers and paracervical ganglion urinary bladder projecting neurons in the female pig* **Czasopismo: Journal of Chemical Neuroanatomy**	70	3.097
7	2015	**Tytuł oryginału:** *Botulinum toxin type A induces changes in the chemical coding of substance P-immunoreactive dorsal root ganglia sensory neurons supplying the porcine urinary bladder* **Czasopismo: Toxins**	30	3.571
		suma:	**800**	**34.384**

- **Publikacje w czasopismach polskich:**

Lp.	Rok	Tytuł publikacji	Punkty MNiSW	Impact Factor
1	2026	**Tytuł oryginału:** *RAGE and Diaph1 deficiency affect retinal cytoarchitecture both in physiological and long-term hyperglycemic settings - a preliminary study* **Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences**	100	1.00
2	2025	**Tytuł oryginału:** *RAGE signaling pathway in inflammatory andvascular pathology of diabetic retinopathy: implications for interventional strategies* **Czasopismo: Acta Neurobiologiae Experimentalis**	100	1.400
		suma:	**200**	**2.400**

Zestawienie punktacyjne całego dorobku publikacyjnego:

Typ publikacji	Łączna liczba prac	Liczba prac z IF	Liczba prac z punktacją MNiSW	Łączna wartość IF	Łączna wartość punktacji MNiSW
artykuł w czasopiśmie zagranicznym	7	7	7	34.384	800
artykuł w czasopiśmie polskim	2	2	2	2.400	200
referat konferencyjny	2	0	0	0	0
streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)	5	0	0	0	0
abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat	8	0	0	0	0
Ogółem:	**24**	**9**	**9**	**36.784**	**1000**

Wykaz publikacji z bazy Bibliografia Publikacji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

1.
IDT: 0000098985.
Rok: 2026
Autorzy:, Mizia Patryk, Kordas Brenard, Mazur Urszula, Jarosławska-Miszkiewicz Julia, Skiepko Natalia, Wąsowicz Krzysztof, Juranek Judyta
Tytuł oryginału: RAGE and Diaph1 deficiency affect retinal cytoarchitecture both in physiological and long-term hyperglycemic settings - a preliminary study
Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences
Opis fizyczny: 2026
Uwagi: preprint
Adres url: https://pjvsci.uwm.edu.pl/articles-in-press/
p-ISSN: 1505-1773
Język publikacji: ENG
Data ukazania się publikacji: 2026.02.11
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 1.000
Punktacja MNiSW: 100.000

2.
IDT: 0000097821.
Rok: 2025
Autorzy: Matuszewski Wojciech, Mazur Urszula, Tomaszek Lena, Kordas Bernard, Mizia Patryk, Mukherjee Konark, Juranek Judyta
Tytuł oryginału: RAGE signaling pathway in inflammatory andvascular pathology of diabetic retinopathy: implications for interventional strategies
Czasopismo: Acta Neurobiologiae Experimentalis
Opis fizyczny: 2025, 85 (3-4), s. 138-148 ; bibliogr. 84 poz.
Adres url: https://ane.pl/index.php/ane/article/view/2714
p-ISSN: 0065-1400
Język publikacji: ENG
DOI: 10.55782/qy1brj72
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2025.12.03
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim
Charakt. merytoryczna: praca przeglądowa
Impact Factor: 1.400
Punktacja MNiSW: 100.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki

farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki leśne;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS
Afiliacja: Matuszewski Wojciech [*] 0000-0001-8279-0373 5e70921c878c28a047390178;334;23, **Mazur Urszula** [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, **Tomaszek Lena** [*] 672c3438ece3984a3962b9cf;336;23, **Kordas Bernard** [*] 0000-0002-7590-5790 60d1cff79543c723365445b0;410;23, **Mizia Patryk** [*] 0000-0001-5973-3506 5e70946f878c28a0473bcf50;410;23, Mukherjee Konark [ ];000;000, **Juranek Judyta** [*] 0000-0001-8665-6606 5e7093b5878c28a0473af717;410;23

3.
IDT: 0000094761.
Rok: 2025
Autorzy: Janikiewicz Paweł, Mazur Urszula, Holak Piotr, Karakina Nastazja, Węglarz Kamil, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Urinary Bladder
Czasopismo: Cells
Opis fizyczny: 2025, 14 (7), s. 1-24 ; bibliogr. 56 poz. ; nr art. 516
Adres url: https://www.mdpi.com/2073-4409/14/7/516
p-ISSN: 2073-4409
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/cells14070516
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2025.04.23
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 5.200
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Cells
Afiliacja: Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Holak Piotr [*] 0000-0002-2050-1959 5e70921b878c28a04738ff90;073;05, Karakina Anastazja [*] 0000-0002-7466-7153 5e70943c878c28a0473b8903;331;23, Węglarz Kamil [*];355;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

4.
IDT: 0000097660.
Rok: 2025
Autorzy: Mazur Urszula, Kuśmierek Paulina, Janikiewicz Paweł, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix
Czasopismo: Cells
Opis fizyczny: 2025, 14 (23), s. 1-29 ; bibliogr. 79 poz. ; nr art. 1847
Adres url: https://www.mdpi.com/2073-4409/14/23/1847
p-ISSN: 2073-4409
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/cells14231847
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2025.11.24
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 5.200
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Cells
Afiliacja: Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Kuśmierek Paulina [*];410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

5.
IDT: 0000087431.
Rok: 2023
Autorzy: Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Janikiewicz Paweł, Łopieńska-Biernat Elżbieta, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons
Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences
Opis fizyczny: 2023, 24 (23), s. 1-25 ; bibliogr. 75 poz. ; nr art. 16647
Adres url: https://www.mdpi.com/1422-0067/24/23/16647
p-ISSN: 1422-0067
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/ijms242316647
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2023.12.08
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection
Impact Factor: 4.900
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria chemiczna;inżynieria materiałowa;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki leśne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;nauki fizyczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
Afiliacja: Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Łopieńska-Biernat Elżbieta [*] 0000-0003-3265-5207 5e709217878c28a04738fc36;021;02, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

6.
IDT: 0000079898.
Rok: 2022
Autorzy: Wasilewska Barbara, Łopieńska-Biernat Elżbieta, Stryiński Robert, Bossowska Agnieszka, Janikiewicz Paweł, Mazur Urszula, Majewski Mariusz

Tytuł oryginału: Neurony zawierające parwalbuminy (PV+) w prążkowiu grzbietowym (StD) nowonarodzonych samic i samców linii WHP (wysoko preferującej alkohol)
Tytuł całości: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgoszcz, 23-25 maj 2022 r. : program i książka streszczeń / kom. nauk. Alina Grzanka et al.
Adres wydawniczy, liczba stron: Bydgoszcz : [s.n.], 2022, s. 22-22
Uwagi: Praca rec.
Adres url: https://www.bydgoszcz.pl/kultura/kalendarium-imprez/wydarzenie/info/2022/05/-/id/23341/
Konferencja/zjazd - tytuł: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgosko-Toruński Oddział Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików przy Katedrze Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Bydgoszcz, PL, 2022.05.23, 2022.05.25
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2022.05.31
Charakt. formalna: referat konferencyjny
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Afiliacja: Wasilewska Barbara [*] 0000-0001-8802-7758 5e709217878c28a04738fc3a;410;23, Łopieńska-Biernat Elżbieta [*] 0000-0003-3265-5207 5e709217878c28a04738fc36;021;02, Stryiński Robert [*] 0000-0001-5518-8854 5e7093e1878c28a0473b2807;021;02, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;355;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23

7.
IDT: 0000079896.
Rok: 2022
Autorzy: Janikiewicz Paweł, Mazur Urszula, Wasilewska Barbara, Węglarz Kamil, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Rozmieszczenie oraz charakterystyka neurochemiczna neuronów zwojów rdzeniowych korzeni grzbietowych (DRG) zawierających feniksynę (PNX) zaopatrujących pęcherz moczowy świni
Tytuł całości: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgoszcz, 23-25 maj 2022 r. : program i książka streszczeń / kom. nauk. Alina Grzanka et al.
Adres wydawniczy, liczba stron: Bydgoszcz : [s.n.], 2022, s. 21-21
Uwagi: Praca rec.
Adres url: https://www.bydgoszcz.pl/kultura/kalendarium-imprez/wydarzenie/info/2022/05/-/id/23341/
Konferencja/zjazd - tytuł: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgosko-Toruński Oddział Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików przy Katedrze Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Bydgoszcz, PL, 2022.05.23, 2022.05.25
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2022.05.31
Charakt. formalna: referat konferencyjny
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Afiliacja: Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;355;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Wasilewska Barbara [*] 0000-0001-8802-7758 5e709217878c28a04738fc3a;410;23, Węglarz Kamil [*];355;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

8.
IDT: 0000079900.
Rok: 2022
Autorzy: Mazur Urszula, Janikiewicz Paweł, Wasilewska Barbara, Węglarz Kamil, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Rozmieszczenie oraz charakterystyka neurochemiczna neuronów zwojów rdzeniowych korzeni grzbietowych

(DRG) zawierających feniksynę (PNX) u świni domowej - badania wstępne
Tytuł całości: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgoszcz, 23-25 maj 2022 r. : program i książka streszczeń / kom. nauk. Alina Grzanka et al.
Adres wydawniczy, liczba stron: Bydgoszcz : [s.n.], 2022, s. 34-34 ; P. 17
Uwagi: Praca rec.
Adres url: https://www.bydgoszcz.pl/kultura/kalendarium-imprez/wydarzenie/info/2022/05/-/id/23341/
Konferencja/zjazd - tytuł: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgosko-Toruński Oddział Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików przy Katedrze Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Bydgoszcz, PL, 2022.05.23, 2022.05.25
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2022.05.31
Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)
Charakt. merytoryczna: varia
Afiliacja: Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;355;23, Wasilewska Barbara [*] 0000-0001-8802-7758 5e709217878c28a04738fc3a;410;23, Węglarz Kamil [*];355;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

9.
IDT: 0000079899.
Rok: 2022
Autorzy: Węglarz Kamil, Janikiewicz Paweł, Mazur Urszula, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Rozmieszczenie oraz charakterystyka neurochemiczna noradrenergicznych neuronów współczulnych zwojów jajnikowych zaopatrujących pęcherz moczowy świni - badania wstępne
Tytuł całości: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgoszcz, 23-25 maj 2022 r. : program i książka streszczeń / kom. nauk. Alina Grzanka et al.
Adres wydawniczy, liczba stron: Bydgoszcz : [s.n.], 2022, s. 33-33 ; P. 15
Uwagi: Praca rec.
Adres url: https://www.bydgoszcz.pl/kultura/kalendarium-imprez/wydarzenie/info/2022/05/-/id/23341/
Konferencja/zjazd - tytuł: 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików "Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym", Bydgosko-Toruński Oddział Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików przy Katedrze Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Bydgoszcz, PL, 2022.05.23, 2022.05.25
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2022.05.31
Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)
Charakt. merytoryczna: varia
Afiliacja: Węglarz Kamil [*];355;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;355;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

10.
IDT: 0000078050.
Rok: 2021
Autorzy: Janikiewicz Paweł, Wasilewska Barbara, Mazur Urszula, Franke-Radowiecka Amelia, Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder
Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Opis fizyczny: 2021, 22 (24), s. 1-24 ; bibliogr. 104 poz. ; nr art. 13399
Adres url: https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13399
p-ISSN: 1422-0067
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/ijms222413399
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AFTER_PUBLICATION
open-access-months: 1
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2022.01.03
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus
Impact Factor: 6.208
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria chemiczna;inżynieria materiałowa;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki leśne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;nauki fizyczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
Afiliacja: Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Wasilewska Barbara [*] 0000-0001-8802-7758 5e709217878c28a04738fc3a;410;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Franke-Radowiecka Amelia [*] 0000-0002-3403-4888 5e70921b878c28a04738ffa9;072;05, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

11.
IDT: 0000074543.
Rok: 2021
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Janikiewicz Paweł, Wasilewska Barbara, Mazur Urszula, Markiewicz Włodzimierz, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: The influence of an adrenergic antagonist guanethidine on the distribution pattern and chemical coding of caudal mesenteric ganglion perikarya and their axons supplying the porcine bladder
Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences
Opis fizyczny: 2021, 22 (9), s. 1-24 ; bibliogr. 133 poz. ; nr art. 4896
Adres url: https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4896
p-ISSN: 1422-0067
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/ijms22094896
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AFTER_PUBLICATION
open-access-months: 1
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2021.05.05
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus
Impact Factor: 6.208
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria chemiczna;inżynieria materiałowa;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki leśne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;nauki fizyczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Wasilewska Barbara [*] 0000-0001-8802-7758 5e709217878c28a04738fc3a;410;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Markiewicz Włodzimierz [*] 0000-0003-2324-852X 5e70921b878c28a04738ff65;077;05, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23

12.
IDT: 0000075759.
Rok: 2021
Autorzy: Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Janikiewicz Paweł, Bossowska Agnieszka
Tytuł oryginału: Somatostatin immunoreactivity within the urinary bladder nerve fibers and paracervical ganglion urinary bladder projecting neurons in the female pig
Czasopismo: Journal of Chemical Neuroanatomy
Opis fizyczny: 2021, 117, s. 1-8 ; bibliogr. 37 poz. ; nr art.102007
p-ISSN: 0891-0618
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1016/j.jchemneu.2021.102007
Data ukazania się publikacji: 2021.05.30
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus
Impact Factor: 3.097
Punktacja MNiSW: 70.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY
Afiliacja: Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;410;23, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23

13.
IDT: 0000011597.
Rok: 2015
Autorzy: Lepiarczyk Ewa, Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: Changes in the chemical coding of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine urinary bladder after resiniferatoxin (RTX) treatment
Czasopismo: European Urology Supplements
Opis fizyczny: 2015, 14 (3), s. e1099 ; nr streszcz. 1
Uwagi: 2nd European Association of Urology Baltic Meeting Riga, Latvia 29-90 May 2015
p-ISSN: 1569-9056
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1016/S1569-9056(15)30002-6
Data ukazania się publikacji: 2015.05.02
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Inne bazy podające opis: Scopus
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki medyczne;nauki o zdrowiu
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS
Afiliacja: Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

14.
IDT: 0000011595.
Rok: 2015
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Mazur Urszula, Janikiewicz Paweł, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: Comparison of resiniferatoxin (RTX) and botulinum toxin (BTX)-induced changes in the chemical coding of sympathetic neurons in the ovarian ganglia supplying the porcine urinary bladder
Czasopismo: European Urology Supplements
Opis fizyczny: 2015, 14 (3), s. e1100 ; nr streszcz. 2
Uwagi: 2nd European Association of Urology Baltic Meeting Riga, Latvia 29-30 May 2015
p-ISSN: 1569-9056
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1016/S1569-9056(15)30003-8
Data ukazania się publikacji: 2015.05.02
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki medyczne;nauki o zdrowiu
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;889;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

15.
IDT: 0000010252.
Rok: 2015
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Mazur Urszula, Janikiewicz Paweł, Markiewicz Włodzimierz
Tytuł oryginału: Botulinum toxin type A induces changes in the chemical coding of substance P-immunoreactive dorsal root ganglia sensory neurons supplying the porcine urinary bladder
Czasopismo: Toxins
Opis fizyczny: 2015, 7 (11), s. 4797-4816 ; bibliogr. 80 poz.
p-ISSN: 2072-6651
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/toxins7114797
Data ukazania się publikacji: 2015.11.16
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus
Impact Factor: 3.571
Punktacja MNiSW: 30.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Toxins
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;889;17, Markiewicz Włodzimierz [*] 0000-0003-2324-852X 5e70921b878c28a04738ff65;077;05

16.
IDT: 0000027406.
Rok: 2015
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Mazur Urszula, Janikiewicz Paweł, Majewska Marta, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: The comparison of ω-conotoxin GIVa, resiniferatoxin and botulinum toxin A effects on the chemical coding of

dorsal root ganglia sensory neurons the 4supplying the porcine urinary bladder
Tytuł równoległy: Porównanie zmian w kodowaniu chemicznym czuciowych neuronów zwojów rdzeniowych korzeni grzbietowych (DRG) zaopatrujących pecherz moczowy świni wywołanych działaniem konotoksyny GIVa (CTX), resiniferatoksyny (RTX) oraz toksyny botulinowej A
Tytuł całości: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików : Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie
Adres wydawniczy, liczba stron: Międzyzdroje : Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 2015, s. 38
Konferencja/zjazd - tytuł: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików : Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Międzyzdroje, PL, 2015.09.09, 2015.09.12
Język publikacji: ENG
Data ukazania się publikacji: 2015.09.09
Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)
Charakt. merytoryczna: varia
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;889;17, Majewska Marta [*] 0000-0001-5856-6929 5e70921c878c28a04739011c;219;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

17.
IDT: 0000027404.
Rok: 2015
Autorzy: Mazur Urszula, Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Janikiewicz Paweł, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: Charakterystyka neurochemiczna neuronów zwoju przyszyjkowego (PCG) zawierającyxh somatostatynę (SOM) zaopatrujących pęcherz moczowy świni - badania wstępne
Tytuł całości: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie
Adres wydawniczy, liczba stron: Międzyzdroje : Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 2015, s. 83 ; nr streszcz. P63
Konferencja/zjazd - tytuł: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików - Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Międzyzdroje, PL, 2015.09.09, 2015.09.12
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2015.09.09
Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)
Charakt. merytoryczna: varia
Afiliacja: Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;889;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

18.
IDT: 0000027397.
Rok: 2015
Autorzy: Janikiewicz Paweł, Bossowska Agnieszka, Lepiarczyk Ewa, Mazur Urszula, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: Wpływ guanetydyny (GUA) na kodowanie chemiczne czuciowych zwojów rdzeniowych korzeni grzbietowych (DRG) zaopatrujących pęcherz moczowy świni
Tytuł całości: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie
Adres wydawniczy, liczba stron: Międzyzdroje : Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 2015, s. 76 ; nr streszcz. P47
Konferencja/zjazd - tytuł: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików - Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików
Konferencja/zjazd - miejsce i data: Międzyzdroje, PL, 2015.09.09, 2015.09.12
Język publikacji: POL
Data ukazania się publikacji: 2015.09.09

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)
Charakt. merytoryczna: varia
Afiliacja: Janikiewicz Paweł [*] 5ebee40f752340254fc44379;889;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

19.
IDT: 0000011594.
Rok: 2014
Autorzy: Lepiarczyk Ewa, Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: The distribution and chemical coding of sympathetic chain neurons supplying the wall of the urinary bladder in normal female pigs and in the pigs after intravesical administration of botulinum toxin (BTX)
Czasopismo: European Urology Supplements
Opis fizyczny: 2014, 13 (2), s. e1174 ; nr streszcz. B38
Uwagi: European Assotiation of Urology (EAU) Baltic Meeting, Vilnius, Lithuania, May 23-25, 2014
p-ISSN: 1569-9056
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1016/S1569-9056(14)50028-0
Data ukazania się publikacji: 2014.06.01
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki medyczne;nauki o zdrowiu
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS
Afiliacja: Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

20.
IDT: 0000017513.
Rok: 2013
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Radziszewski Piotr, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: The comparison of conantokin G (CTG), resiniferatoxin (RTX) and botulinum toxin A (BTX) effects on the chemical coding of dorsal root ganglia (DRG) neurons supplying porcine urinary bladder
Czasopismo: Journal of Molecular Neuroscience
Opis fizyczny: 2013, 51 (Suppl. 1), s. S164-S165 ; abstr. nr F3
Uwagi: X Congress European Neuropeptide Club. Summer Neurpeptide Conference Polish Society of Veterinary Sciences. 29.05-01.06.13 Gdynia, Poland. Program, abstract book; Neuropeptides 2013 Conference
p-ISSN: 0895-8696
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1007/s12031-013-0124-3
Data ukazania się publikacji: 2013.10.06
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Radziszewski Piotr [ ];000;000, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

21.
IDT: 0000048492.

Rok: 2013
Autorzy: Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Radziszewski Piotr, Majewski Mariusz
Tytuł oryginału: The comparison of conantokin G (CTG), resiniferatoxin (RTX) and botulinum toxin A (BTX) effects on the chemical coding of dorsal root ganglia (DRG) neurons supplying porcine urinary bladder
Czasopismo: Journal of Molecular Neuroscience
Opis fizyczny: 2013, 51 (suppl. 1), s. 164-165
Uwagi: 21st Annual Meeting of the Israel-Society-for-Neuroscience / 1st Binational Australian-Israeli Meeting on Neuroscience; Eilat, ISRAEL; 15.12.2012
p-ISSN: 0895-8696
Język publikacji: ENG
Data ukazania się publikacji: 2013.11.01
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE
Afiliacja: Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Radziszewski Piotr [ ];000;000, Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17

22.
IDT: 0000017512.
Rok: 2013
Autorzy: Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Radziszewski Piotr, Borkowski Andrzej S.
Tytuł oryginału: The comparison of the effects of guanethidine (GUA), resiniferatoxin (RTX) and tetrodotoxin (TTX) on the chemical ciding of inferior mesenteric ganglion (IMG) neurons supplying porcine urinary bladder
Czasopismo: Journal of Molecular Neuroscience
Opis fizyczny: 2013, 51 (Suppl. 1), s. S155-S156 ; abstr. nr T2
Uwagi: X Congress European Neuropeptide Club. Summer Neurpeptide Conference Polish Society of Veterinary Sciences. 29.05-01.06.13 Gdynia, Poland. Program, abstract book; Neuropeptides 2013 Conference
p-ISSN: 0895-8696
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1007/s12031-013-0124-3
Data ukazania się publikacji: 2013.10.06
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE
Afiliacja: Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Radziszewski Piotr [ ];000;000, Borkowski Andrzej S. [ ];000;000

23.
IDT: 0000048498.
Rok: 2013
Autorzy: Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Radziszewski Piotr, Borkowski Andrzej S.
Tytuł oryginału: The comparison of the effects of guanethidine (GUA), resiniferatoxin (RTX) and tetrodotoxin (TTX) on the chemical coding of inferior mesentgeric ganglion (IMG) neurons supplying porcine urinary bladder
Czasopismo: Journal of Molecular Neuroscience
Opis fizyczny: 2013, 51 (suppl. 1), s. 155-156
Uwagi: 21st Annual Meeting of the Israel-Society-for-Neuroscience / 1st Binational Australian-Israeli Meeting on Neuroscience;

Eilat, ISRAEL; 15.12.2012
p-ISSN: 0895-8696
Język publikacji: ENG
Data ukazania się publikacji: 2013.11.01
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE
Afiliacja: Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;219;17, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;219;17, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;219;17, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;219;17, Radziszewski Piotr [ ];000;000, Borkowski Andrzej S. [ ];000;000

24.
IDT: 0000075663.
Rok: 2013
Autorzy: Majewski Mariusz, Bossowska Agnieszka, Mazur Urszula, Lepiarczyk Ewa, Radziszewski Piotr, Borkowski Andrzej
Tytuł oryginału: The comparison of the effects ofguanethidine (GUA), resiniferatoxin (RTX) and tetrodotoxin (TTX) on the chemicalcoding of inferior mesenteric ganglion (IMG) neurons supplying porcine urinarybladder
Czasopismo: Journal of Molecular Neuroscience
Opis fizyczny: 2013, 51, s. S155-S156 ; abstr. nr T12
Uwagi: X Congress European Neuropeptide Club. Summer Neurpeptide Conference Polish Society of Veterinary Sciences. 29.05-01.06.13 Gdynia, Poland. Program, abstract book; Neuropeptides 2013 Conference
p-ISSN: 0895-8696
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1007/s12031-013-0124-3
Data ukazania się publikacji: 2013.10.06
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE
Afiliacja: Majewski Mariusz [*] 0000-0001-5818-7689 5e70921c878c28a0473900f7;410;23, Bossowska Agnieszka [*] 0000-0002-5446-0171 5e70921c878c28a047390121;410;23, Mazur Urszula [*] 0009-0007-8461-3304 5e7094af878c28a0473c1970;410;23, Lepiarczyk Ewa [*] 0000-0003-2998-9468 5e70921c878c28a04739015b;410;23, Radziszewski Piotr [ ];000;000, Borkowski Andrzej [ ];000;000

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 8.12.2025

Urszula Mazur
(imię i nazwisko kandydata)

Nauki medyczne
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: wykonaniu oraz analizie badań laboratoryjnych, wizualizacja danych oraz wyników, przygotowaniu oryginalnego manuskryptu.

Urszula Mazur
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 8.12.2025
(miejscowość, data)

dr hab. n. med. Ewa Lepiarczyk, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pobraniu materiału, pomocy przy pisaniu oraz edycji manuskryptu, współudziale przy wizualizacji danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Ewa Lepiarczyk
.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 8.12.2025
(miejscowość, data)

lek. Paweł Janikiewicz
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w zbieraniu danych do analiz.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Paweł Janikiewicz
.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 8.12.2025
(miejscowość, data)

dr hab. Elżbieta Łopieńska-Biernat
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: walidacji zastosowanej metody oraz pomoc przy wizualizacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Elżbieta Łopieńska-Biernat
.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 08.12.2025
(miejscowość, data)

prof. dr hab. Mariusz Krzysztof Majewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pobraniu materiału, współudziale w: opracowaniu koncepcji badań i określeniu celu badań, recenzji oraz edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 08.12.2025
(miejscowość, data)

dr hab. n. med. Agnieszka Bossowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur,** Ewa Lepiarczyk, Paweł Janikiewicz, Elżbieta Łopieńska-Biernat, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2023).** *Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons.* International Journal of Molecular Science. 24(23):16647, doi: 10.3390/ijms242316647 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pobraniu materiału, współudziale w: opracowaniu koncepcji badań i określeniu celu badań, nadzorze przy pisaniu, analizie, recenzji oraz edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

A. Bossowska
podpis/podpisy

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 12.12.2025

Urszula Mazur
(imię i nazwisko kandydata)

Nauki medyczne
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2025).** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix.* Cells. 14(23), 1847, doi.org/10.3390/cells14231847 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pomocy w pobraniu materiału, wykonaniu oraz analizie badań laboratoryjnych, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Urszula Mazur
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 12.12.2025
(miejscowość, data)

mgr Paulina Kuśmierek
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2025).** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix.* Cells. 14(23), 1847, doi.org/10.3390/cells14231847 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pomocy przy pobraniu materiału, pomocy przy przygotowaniu materiału do barwień.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Paulina Kuśmierek
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 12.12.2025
(miejscowość, data)

lek. Paweł Janikiewicz
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2025).** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix.* Cells. 14(23), 1847, doi.org/10.3390/cells14231847 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pomocy przy wizualizacji danych oraz wyników badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

Paweł Janikiewicz
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 12.12.2025
(miejscowość, data)

prof. dr hab. Mariusz Majewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2025).** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix.* Cells. 14(23), 1847, doi.org/10.3390/cells14231847 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pobraniu materiału, współudziale w: opracowaniu koncepcji badań i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, przygotowaniu manuskryptu (recenzja, redakcja).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 12.12.2025
(miejscowość, data)

dr hab. n. med. Agnieszka Bossowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Urszula Mazur**, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski, Agnieszka Bossowska **(2025).** *Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix.* Cells. 14(23), 1847, doi.org/10.3390/cells14231847 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: pobraniu materiału, współudziale w: opracowaniu koncepcji badań i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, walidacji, interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu (analiza, recenzja, redakcja).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Urszulę Mazur** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Urszuli Mazur** polegający na wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, współudziale w: opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, opracowaniu metodyki badań, interpretacji oraz wizualizacji wyników badań, napisaniu manuskryptu.

.....
podpis/podpisy

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons

Urszula Mazur [1,*], Ewa Lepiarczyk [1], Paweł Janikiewicz [1], Elżbieta Łopieńska-Biernat [2], Mariusz Krzysztof Majewski [1] and Agnieszka Bossowska [1]

[1] Department of Human Physiology and Pathophysiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Warszawska 30, 10-082 Olsztyn, Poland; ewa.lepiarczyk@uwm.edu.pl (E.L.); pawel.janikiewicz@uwm.edu.pl (P.J.); mariusz.majewski@uwm.edu.pl (M.K.M.); agnieszka.bossowska@uwm.edu.pl (A.B.)
[2] Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, Poland; ela.lopienska@uwm.edu.pl
* Correspondence: urszula.mazur@uwm.edu.pl; Tel.: +48-89-524-56-42

Abstract: Phoenixin-14 (PNX), initially discovered in the rat hypothalamus, was also detected in dorsal root ganglion (DRG) cells, where its involvement in the regulation of pain and/or itch sensation was suggested. However, there is a lack of data not only on its distribution in DRGs along individual segments of the spinal cord, but also on the pattern(s) of its co-occurrence with other sensory neurotransmitters. To fill the above-mentioned gap and expand our knowledge about the occurrence of PNX in mammalian species other than rodents, this study examined (i) the pattern(s) of PNX occurrence in DRG neurons of subsequent neuromeres along the porcine spinal cord, (ii) their intraganglionic distribution and (iii) the pattern(s) of PNX co-occurrence with other biologically active agents. PNX was found in approximately 20% of all nerve cells of each DRG examined; the largest subpopulation of PNX-positive (PNX^+) cells were small-diameter neurons, accounting for 74% of all PNX-positive neurons found. PNX^+ neurons also co-contained calcitonin gene-related peptide (CGRP; 96.1%), substance P (SP; 88.5%), nitric oxide synthase (nNOS; 52.1%), galanin (GAL; 20.7%), calretinin (CRT; 10%), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 7.4%), cocaine and amphetamine related transcript (CART; 5.1%) or somatostatin (SOM; 4.7%). Although the exact function of PNX in DRGs is not yet known, the high degree of co-localization of this peptide with the main nociceptive transmitters SP and CGRP may suggests its function in modulation of pain transmission.

Keywords: phoenixin-14 (PNX); pig; dorsal root ganglia (DRG); neuropeptides; immunofluorescence; mass spectrometry

check for updates

Citation: Mazur, U.; Lepiarczyk, E.; Janikiewicz, P.; Łopieńska-Biernat, E.; Majewski, M.K.; Bossowska, A. Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16647. https://doi.org/10.3390/ijms242316647

Academic Editor: Ivana Caputo

Received: 24 October 2023
Revised: 18 November 2023
Accepted: 21 November 2023
Published: 23 November 2023

Copyright: © 2023 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/).

1. Introduction

Phoenixin-14 (PNX), first described by Yosten et al. in 2013 [1], was initially linked to reproductive system control, due to the high expression of this peptide in the rodent hypothalamus and pituitary gland, where, by acting through the orphan receptor G protein-coupled receptor 173 (GPR173), PNX was found to activate gonadotropin-releasing hormone-secreting cells, leading to the release of luteinizing hormone or follicle-stimulating hormone by pituitary gonadotrophs [1,2]. Nine years after PNX's identification, further studies revealed that the presence of this peptide is not limited to the hypothalamo-pituitary complex and an engagement of PNX in the central control of several other biological processes, including food intake, energy homeostasis, water balance and modulation of inflammation or memory and anxiety, has also been reviewed [3,4].

Regarding the presence and putative function(s) of PNX in the peripheral nervous system (PNS), it should be emphasized that currently there is a huge gap in our knowledge regarding this aspect of PNX's role, especially in the afferent part of the PNS: the existing data, coming almost exclusively from rat models, indicate the presence of PNX-immunoreactivity (PNX-IR) structures in the spinal trigeminal tract and nucleus of the solitary tract, the superficial layers of the dorsal horn (DH), the trigeminal and nodose ganglion cells and last, but not least, in neurons located in the dorsal root ganglia (DRGs) [5]. Quite recently, PNX-IR has been detected in nerve fibers (NFs) forming a dense plexus in laminae I and II of the porcine DH [6]. Although the results of the above-mentioned study support the hypothesis that there is probably a relatively large population of PNX-IR neurons in the DRGs that project axons to the superficial laminae of the DH, there are no clear data confirming either the presence of PNX in the DRGs of individual spinal cord neuromeres or their intraganglionic distribution pattern(s). Moreover, with the exception of one mention of colocalization of PNX and substance P (SP) in rat dorsal root ganglia (DRG) cells [5], there are no data available regarding the colocalization pattern(s) of PNX with other biologically active substances in specific subpopulations of DRG neurons (small-, medium- and large-diameter cells), which are believed to be involved in the regulation of different neural activities.

Therefore, in order to create a basis for further, more detailed research on the role of PNX in the sensory part of the peripheral nervous system, the present study investigated (i) the pattern of PNX-IR sensory neuron occurrence in the DRGs of selected spinal cord neuromeres; (ii) pattern(s) of intraganglionic distribution of PNX-positive (PNX^+) cells in the examined sensory ganglia and (iii) pattern(s) of colocalization of PNX with other markers of sensory neurons (cocaine- and amphetamine-regulated transcript, CART; calretinin, CRT; calcitonin gene-related peptide, CGRP; galanin, GAL; neuronal nitric oxide synthase, nNOS; pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP; SP; somatostatin, SOM) in DRG neurons at different levels of the porcine spinal cord (cervical—C; thoracic—Th; lumbar—L and sacral—S). The domestic pig was chosen, as this species is increasingly employed as an animal model in studies because of its anatomical and physiological similarities to humans concerning both the structure and function of various tissues and organs [7–10].

2. Results

2.1. Mass Spectrometry Detection of PNX in Pigs DRG

The presence of "true" PNX in porcine DRGs was analyzed in the ganglia of the L5 neuromere. The mass spectrometry analyses confirmed the identity of the peptide with a molecular weight of 1583 +/− 1.5 Da. The above study identified the fractional spectra of most of the amino acids that make up PNX: DVQPPGLKVQSDPF. The list of mass spectra of each amino acid that makes up PNX is shown in Supplementary Figures S1–S3. Below is an example of a DRG L5 chromatogram (Figure 1).

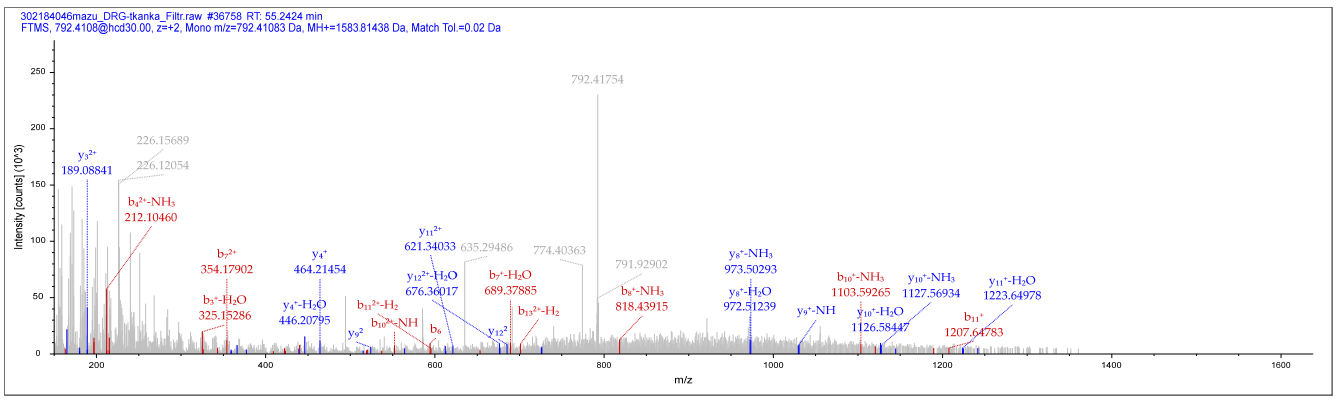


Figure 1. Phoenixin-14 (PNX) fragmentation spectrum-amidated (-0.98402 Da), derived from dorsal root ganglion (DRG) L5 from pig number 1 (DRG1).

2.2. Distribution Pattern and Morphometrical Characteristics of PNX-Containing Sensory Neurons in Studied DRGs

2.2.1. Distribution Pattern of PNX$^+$ Neurons

PNX$^+$ nerve cells were observed bilaterally in all the studied DRGs. The total number of PNX$^+$ sensory neurons counted in all the studied DRGs per animal ranged from 16714 to 19675 (18481 ± 1562; mean ± standard deviation—SD), representing 19.7 ± 1.0% of all the sensory neurons counted in the investigated DRG. In the left ganglia, the number of PNX-containing sensory neurons ranged from 7806 to 9963 per animal (9092 ± 1137) and accounted for 19.1 ± 0.6% of all the sensory neurons. Very similar results regarding both the number and percentage of PNX$^+$ nerve cells were obtained in the right ganglia in which the number of PNX-labeled perikarya ranged from 8908 to 9712 per animal (9390 ± 425) and accounted for 19.3 ± 1.5% of all the sensory neurons.

The PNX$^+$ sensory neurons were observed in all the selected C, Th, L and S DRG (20.2 ± 1.4%, 16.5 ± 1.5%, 19.4 ± 1.0% and 21.4 ± 2.5%, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX-containing sensory nerve cells were observed between the left and right ganglia from the same level of the spinal cord and between the ganglia located in various levels of the spinal cord examined. Details concerning the relative frequency of PNX$^+$ sensory neurons observed in the selected left and the right DRG taken from the C, Th, L and S levels of the spinal cord are shown in Table 1 and Figure 2.

Table 1. Relative frequency of PNX-positive (PNX$^+$) neuronal profiles located in the left and right DRGs of the cervical (C), thoracic (Th), lumbar (L) and sacral (S) levels of the spinal cord. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± standard deviation (SD) (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)										
DRG	**C1**	**C4**	**C7**	**Th1**	**Th7**	**Th15**	**L1**	**L3**	**L6**	**S1**	**S3**
left	21.5 ± 3.9	17.5 ± 3.1	21.9 ± 1.7	16.2 ± 2.0	17.3 ± 0.7	15.4 ± 2.3	17.8 ± 2.4	16.3 ± 0.8	23.3 ± 3.6	22.8 ± 2.0	20.4 ± 4.6
right	18.5 ± 7.2	21.1 ± 6.6	20.9 ± 1.0	16.8 ± 1.9	17.2 ± 0.6	16.1 ± 3.7	15.7± 4.1	17.6 ± 2.0	25.8 ± 1.2	24.6 ± 0.9	18.0 ± 7.6

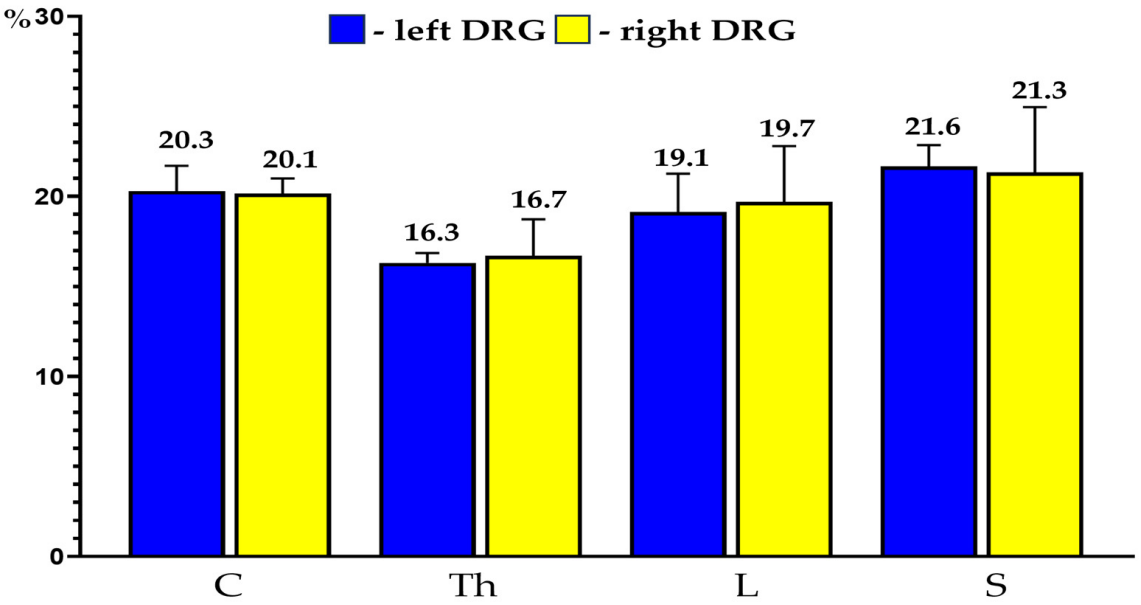


Figure 2. Bar diagram showing the relative percentages of PNX$^+$ sensory neurons located in the left (blue bars) and the right (yellow bars) DRGs of the C, Th, L and S segments of the spinal cord. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

2.2.2. Morphometrical Characteristics of PNX$^+$ Neurons

In the present study, the PNX$^+$ DRG neurons belonged to all cell sizes: small (Sl) (neurons with an average diameter of up to 40 µm), medium (M) (neurons with a diameter from 41 µm to 70 µm) and large (Lg) (neurons with a diameter up to 71 µm). In general, the vast majority of PNX$^+$ sensory neurons belonged to Sl-sized cells (73.9 ± 4.7%) which prevailed over the M-sized sensory neurons (24.9 ± 4.7%), while the Lg nerve cells (1.2 ± 0.8%) were only occasionally found in all the DRGs studied. There were no significant differences in the number of PNX-containing sensory neurons belonging to these three size classes between the left and the right DRGs. When comparing the relative frequencies of Sl, M and Lg perikarya in the left and right DRGs, Sl cells constituted the largest population of PNX$^+$ neurons (70.6 ± 13.9% vs. 73.8 ± 4.9%) and M-sized cells constituted a smaller population (24.8 ± 5.3% vs. 25.1 ± 4.9%), while only a few Lg-sized cells (1.0 ± 0.9% vs. 1.1 ± 0.8%) were found. Moreover, no statistically significant differences in the number of PNX-labeled neurons belonging to the Sl-, M- and Lg-sized populations of sensory nerve cells were observed between the C, Th, L and S DRGs. The details on the relative frequency of PNX$^+$ sensory neurons of the different size classes in the selected left and the right DRGs at the C, Th, L and S levels of the spinal cord are shown in Table 2 and Figure 3. Representative images of the PNX$^+$ DRG nerve cells belonging to the different size classes are shown in Figure 4.

Table 2. Percentages of PNX$^+$ neuronal populations of different sizes (small—Sl; medium—M; large—Lg) located in the left and the right DRGs of the C, Th, L and S segments of the spinal cord. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of The Spinal Cord (%)											
	C			Th			L			S		
DRG	Sl	M	Lg	Sl	M	Lg	Sl	M	Lg	Sl	M	Lg
left	74.7 ± 3.1	23.9 ± 2.3	1.4 ± 0.9	70.6 ± 3.1	28.5 ± 2.9	0.9 ± 0.3	75.4 ± 5.9	23.8 ± 5.8	0.8 ± 0.6	76.3 ± 1.0	21.9 ± 0.8	1.8 ± 0.2
right	76.7 ± 3.1	22.1 ± 2.9	1.2 ± 0.6	71.4 ± 4.9	27.8 ± 4.7	0.8 ± 0.7	72.4 ± 5.2	26.6 ± 5.2	1.0 ± 0.6	75.4 ± 4.8	22.5 ± 4.8	2.1 ± 0.9

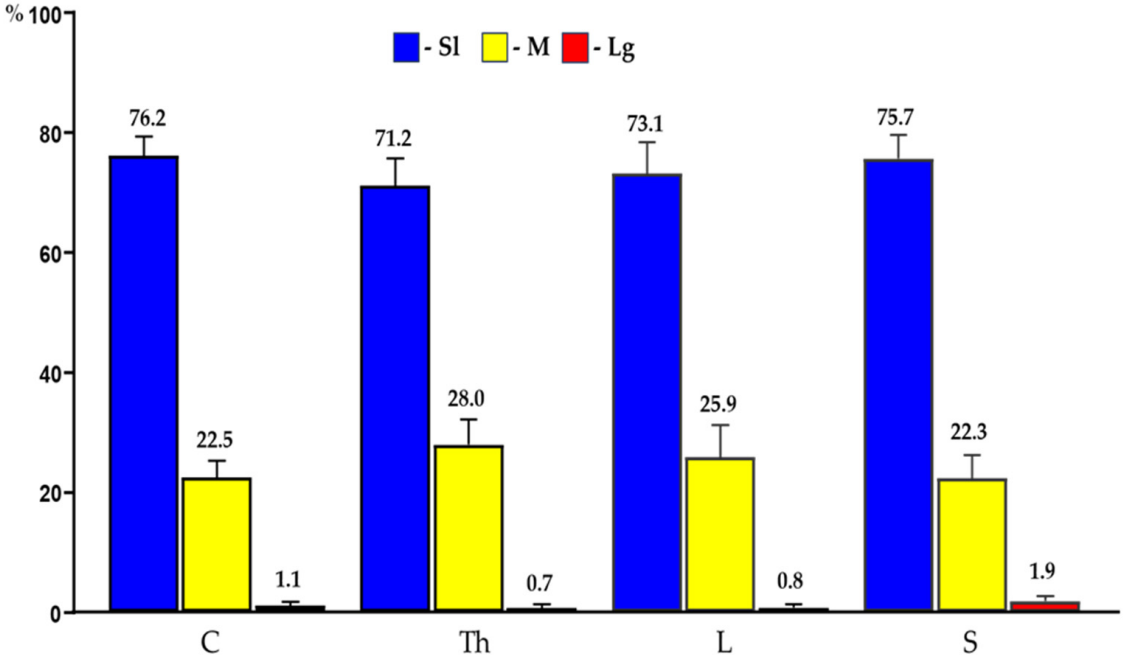


Figure 3. Bar diagram summarizing the percentages of differently sized (Sl; M; Lg) PNX$^+$ sensory nerve cells found in C, Th, L and S segments of the spinal cord. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

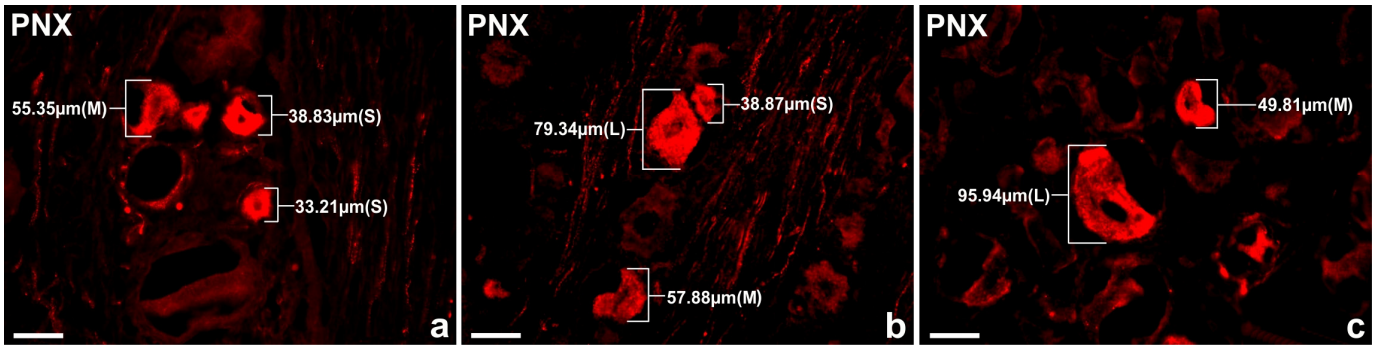


Figure 4. Representative images of the PNX+ nerve cells in the porcine DRG L1 belonging to the different size classes: (**a**) Sl cells (33.21 µm, 38.83 µm), M cells (55.35 µm); (**b**) Sl cell (38.87 µm), M cell (57.88 µm), Lg cell (79.34 µm); (**c**) M cell (49.81 µm), Lg cell (95.94 µm). Scale bar: 50 µm.

2.2.3. Intraganglionic Distribution Patterns of PNX+ Neurons

To determine the intraganglionic distribution pattern(s) of the PNX+ sensory neurons in all the studied DRGs, the 'mask' shown in Figure 5 was applied to each analyzed ganglion section.

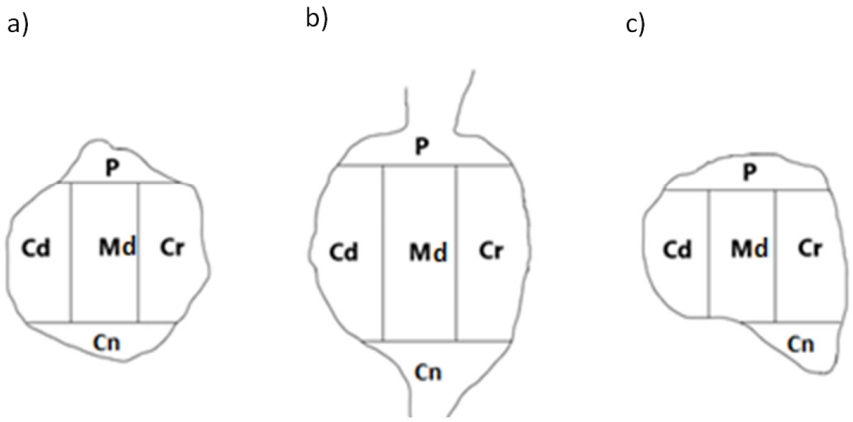


Figure 5. A schematic diagram of the DRG section showing its arbitrary division into topographical domains and in which, the occurrence and relative frequency of PNX-containing sensory neurons were studied: P—peripheral domain; Cr—cranial domain; Cd—caudal domain; Cn—central domain of the DRG; Md—middle ganglion area. Section from the (**a**) proximal (**b**) middle and (**c**) distal part of the ganglion.

The PNX-containing sensory nerve cells were present in all five ganglion domains: central (Cn), peripheral (P), cranial (Cr), caudal (Cd) and middle (Md). In both the left and the right ganglia, the vast majority of observed nerve cells were clustered in the Cn part of the ganglion (29.1 ± 6.2% and 27.4 ± 2.2%, respectively), while fewer PNX+ sensory neurons (10.9 ± 3.6% and 12.1 ± 5.3%) were observed in the P domain of the DRG. The rest of the PNX+ perikarya were dispersed quite evenly in the Md (21.4 ± 3.1% and 21.5 ± 0.9%), Cr (19.7 ± 1.5% and 19.1 ± 2.2%) and Cd (18.9 ± 1.3% and 19.9 ± 1.2%) domains of the ganglion. There were no statistically significant differences in the number of PNX+ nerve cells observed in the same domains of the left and the right DRG studied. Moreover, a similar intraganglionic distribution pattern of PNX+ neurons was observed in all the studied DRGs from the C, Th, L and S segments of the spinal cord. The details concerning the intraganglionic distribution pattern of PNX+ sensory neurons in particular domains of the left and the right DRGs are shown in Table 3.

Table 3. Intraganglionic distribution pattern of PNX$^+$ neuronal populations located in the bilateral DRGs in the C, Th, L and S segments of the spinal cord. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

DRG Subdomain	Segments of the Spinal Cord (%)							
	C		Th		L		S	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
P	15.1 ± 2.7	19.4 ± 2.1	12.1 ± 2.3	11.2 ± 1.8	10.7 ± 0.7	11.3 ± 2.0	11.3 ± 2.1	10.6 ± 1.3
Cr	20.9 ± 1.7	18.7 ± 1.2	20.4 ± 1.7	22.1 ± 1.6	20.1 ± 1.4	18.5 ± 3.8	20.4 ± 1.9	21.3 ± 4.2
Cd	17.3 ± 3.2	16.6 ± 1.5	17.4 ± 1.9	19.1 ± 2.4	19.2 ± 3.5	19.5 ± 1.9	18.1 ± 1.4	19.4 ± 4.1
Cn	24.2 ± 5.0	25.1 ± 3.9	26.1 ± 4.5	26.3 ± 1.8	27.9 ± 5.7	28.8 ± 4.5	31.1 ± 6.0	26.1 ± 6.7
Md	22.5 ± 1.5	20.2 ± 2.1	24.0 ± 1.3	21.3 ± 0.9	22.1 ± 5.8	21.9 ± 2.1	19.1 ± 1.9	22.6 ± 4.4

2.3. Immunohistochemical Characteristic of PNX-Containing Perikarya in DRGs

A comprehensive analysis of double immunohistochemical staining showed the presence of PNX-IR sensory nerve cells together with other biologically active substances like CGRP, SP, nNOS, GAL, CRT, PACAP, CART or SOM in all the studied DRGs.

2.3.1. PNX$^+$/CGRP$^+$ Nerve Cells

The largest subpopulation of PNX$^+$ DRG sensory nerve cells were neurons simultaneously containing CGRP (Figure 6a,b). Such cells accounted for 96.1 ± 0.8% of the total population of PNX-IR neurons located in all the examined DRGs, while only a very small number of PNX$^+$ nerve cells (3.9 ± 0.8%) did not simultaneously express CGRP. The PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons were observed in all the studied DRGs of the C, Th, L and S segments of the spinal cord (96.9 ± 3.3%; 95.1 ± 4.0%; 96.9 ± 2.7%; and 96.1 ± 3.2%, respectively). Statistically significant differences in the number of PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons were not observed between selected DRGs of a given level of the spinal cord nor between DRGs from different spinal cord levels.

Regarding their diameter, the PNX/CGRP-containing cells belonged to all three classes of afferent perikarya. The most numerous subpopulation of PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons was that of Sl-sized cells (69.2 ± 8.8%); the M-sized neurons were found to be distinctly less numerous (29.1 ± 8.3%), while Lg PNX$^+$ and CGRP-containing nerve cells (1.7 ± 0.5%) were rarely observed. No significant differences in the number of PNX$^+$/CGRP$^+$ DRG neurons belonging to the different size classes were observed between different levels of the spinal cord (Table 4).

Table 4. Relative frequency of different sizes (Sl, M, Lg) of PNX$^+$/CGRP$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

Size of DRG Cells	Segments of the Spinal Cord (%)			
	C	Th	L	S
Sl	57.1 ± 21.4	71.5 ± 4.9	73.3 ± 11.4	75.1 ± 6.7
M	42.10 ± 21.7	27.0 ± 4.9	26.1 ± 11.9	21.3 ± 3.2
Lg	0.8 ± 0.7	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.6	3.6 ± 3.6

The PNX$^+$/CGRP$^+$ sensory neurons were evenly dispersed in the individual DRG sections; a clear accumulation of these cells was observed in the Cn, Md, and Cr ganglion domains (25.3 ± 2.5%; 25.3 ± 0.7%; and 20.6 ± 1.3%, respectively), while a smaller number of PNX$^+$/CGRP$^+$ nerve cells was found in the Cd and the P parts (18.1 ± 1.8% and 10.7 ± 1.3%) of all the studied DRGs. The distribution pattern of the PNX$^+$ and CGRP-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7a.

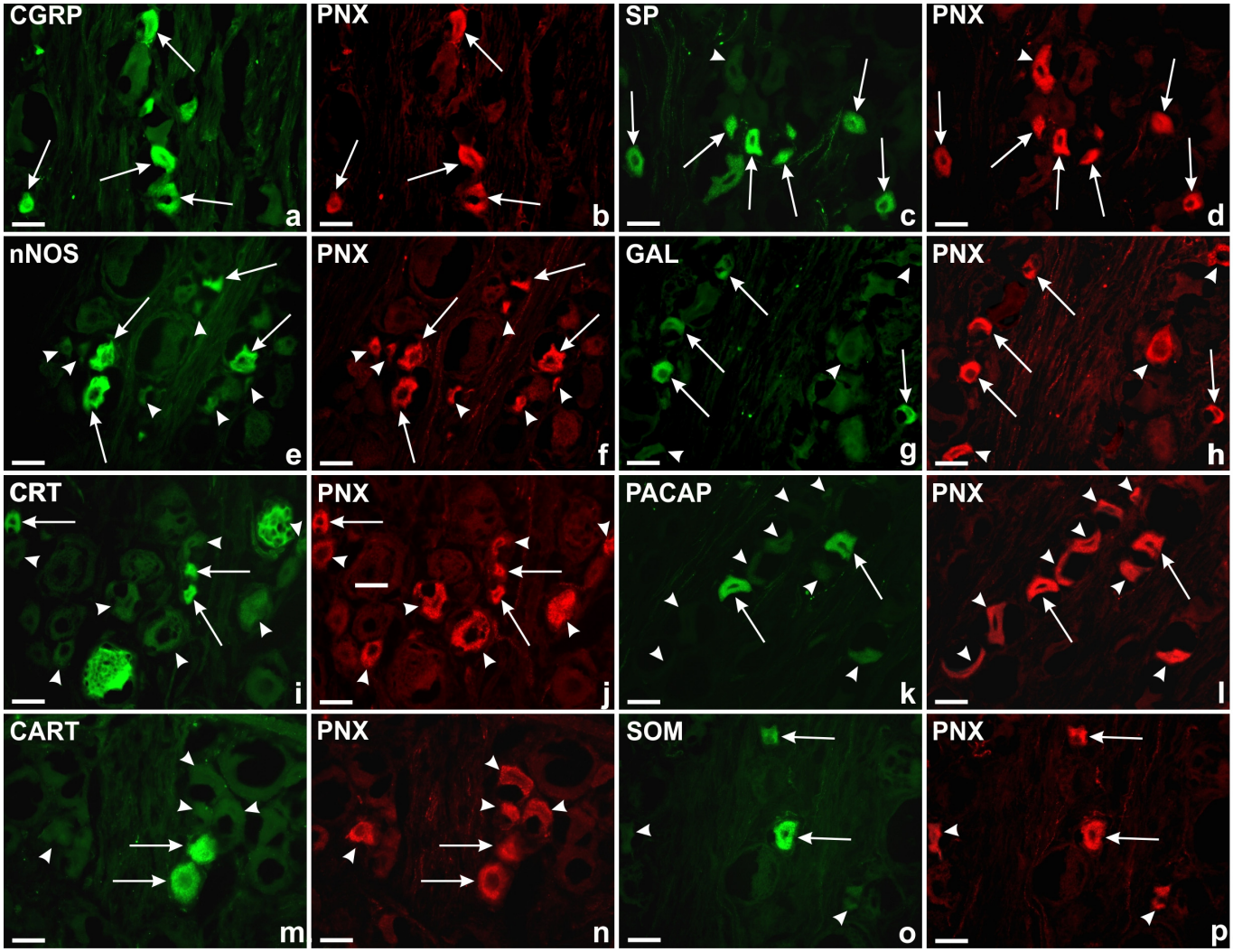


Figure 6. Representative images of the DRG sensory neurons. All the images were taken separately in green (fluorescein isothiocyanate—FITC) (**a**,**c**,**e**,**g**,**i**,**k**,**m**,**o**) and red (streptavidin—CY3) (**b**,**d**,**f**,**h**,**j**,**l**,**n**,**p**) fluorescent channels. Long arrows represent PNX^+ cells (**b**,**d**,**f**,**h**,**j**,**l**,**n**,**p**) that simultaneously contain (**a**) calcitonin gene-related peptide (CGRP; 96.1%), (**c**) substance P (SP; 88.5%), (**e**) neuronal nitric oxide synthase (nNOS; 52.1%), (**g**) galanin (GAL; 20.7%), (**i**) calretinin (CRT; 10%), (**k**) pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 7.4%), (**m**) cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART; 5.1%), (**o**) somatostatin (SOM; 4.7%); arrowheads represent DRG PNX^+ sensory nerve cells (**d**,**f**,**h**,**j**,**l**,**n**,**p**) which were simultaneously immunonegative for CGRP (**a**), SP (**c**), nNOS (**e**), GAL (**g**), CRT (**i**), PACAP (**k**), CART (**m**) and SOM (**o**). Scale bar: 50 µm.

2.3.2. PNX^+/SP^+ Nerve Cells

The second most numerous subpopulation of PNX^+ sensory neurons in the investigated DRGs was that containing SP (88.5 ± 5.9%; Figure 6c,d), which was present in all the selected DRGs from the C, Th, L and S levels of the spinal cord (88.8 ± 4.9%, 87.5 ± 6.5%, 87.4 ± 7.3% and 90.3 ± 4.5%, respectively). No statistically significant differences were observed in the number of PNX^+/SP^+ sensory nerve cells between the selected DRGs in a given level of the spinal cord as well as between the different levels of the spinal cord.

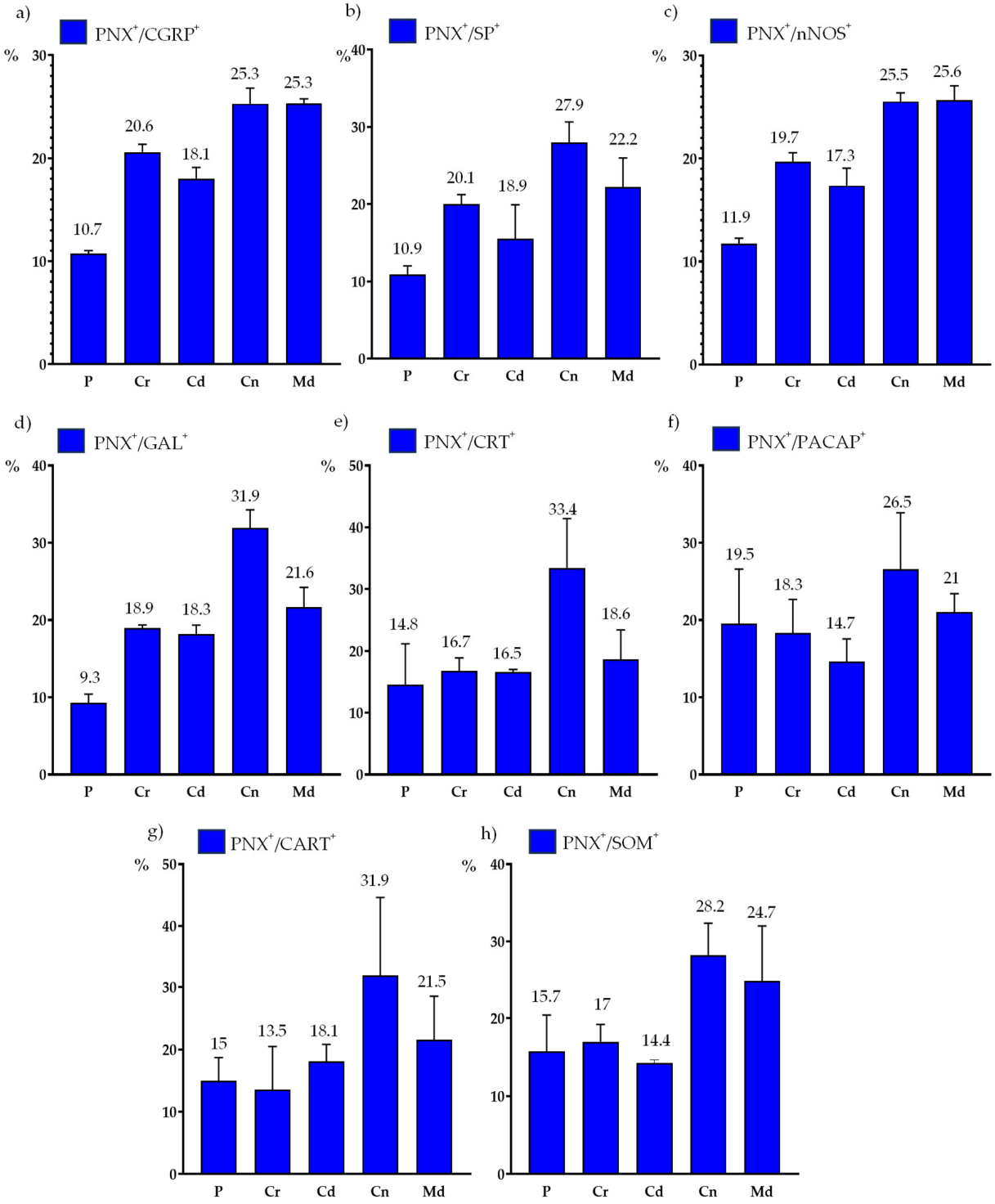


Figure 7. Distribution pattern of PNX$^+$ neurons containing neurotransmitters in different domains (P, Cr, Cd, Cn and Md) of the DRG: (**a**) PNX$^+$/CGRP$^+$ sensory neurons, (**b**) PNX$^+$/SP$^+$ sensory neurons, (**c**) PNX$^+$/nNOS$^+$ sensory neurons, (**d**) PNX$^+$/GAL$^+$ sensory neurons, (**e**) PNX$^+$/CRT$^+$ sensory neurons, (**f**) PNX$^+$/PACAP$^+$ sensory neurons, (**g**) PNX$^+$/CART$^+$ sensory neurons, (**h**) PNX$^+$/SOM$^+$ sensory neurons. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

In general, SP-IR was observed in all three size classes of PNX$^+$ afferent perikarya, being present in 62.05 ± 6.7% of Sl, 36.9 ± 7.1% of M and 1.05 ± 0.4% of Lg cells. There

were no significant differences in the number of PNX$^+$/SP$^+$ DRG neurons representing the different size classes between the different levels of the spinal cord (for details, see Table 5).

Table 5. Relative frequency of different sizes of PNX$^+$/SP$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	53.4 ± 25.1	59.8 ± 11.2	67.3 ± 13.4	67.7 ± 11.7
M	45.9 ± 25.3	39.4 ± 11.8	31.2 ± 12.7	31.0 ± 11.0
Lg	0.7 ± 0.6	0.8 ± 0.6	1.5 ± 0.9	1.3 ± 0.7

Additionally, most of the PNX$^+$/SP$^+$ neurons were unevenly distributed in different sensory ganglion domains. A clear accumulation of PNX$^+$ and SP-containing sensory nerve cells was found in the Cn, Md, Cr and Cd domains of the DRGs (27.9 ± 4.6%, 22.2 ± 6.5%, 20.1 ± 2.1% and 18.9 ± 7.6%, respectively). A smaller number of PNX$^+$/SP$^+$ sensory neurons was found in the P part (10.9 ± 1.9%) of the studied DRGs. The distribution pattern of the PNX$^+$ and SP-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7b.

2.3.3. PNX$^+$/nNOS$^+$ Nerve Cells

The third largest subpopulation of PNX$^+$ neurons in all the studied DRGs was that containing nNOS (52.1 ± 11.2%; Figure 6e,f). PNX$^+$/nNOS$^+$ sensory nerve cells were observed in all the studied DRGs from the C, Th, L and S levels of the spinal cord (50.1 ± 16.5%, 56.9 ± 11.6%, 49.8 ± 7.0% and 51.7 ± 9.5%, respectively). No statistically significant differences in the numbers of PNX$^+$/nNOS$^+$ neurons were observed between the selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

In terms of their diameters, three classes of the PNX$^+$/nNOS$^+$ DRG neurons were observed. The most numerous subpopulation was formed by M-sized cells (52.4 ± 6.6%) and a less numerous one by Sl-sized perikarya (46.1 ± 6.9%), while Lg PNX$^+$/nNOS$^+$ neurons (1.5 ± 0.4%) were only observed sporadically. There were no significant differences in the number of PNX$^+$/nNOS$^+$ DRG neurons representing different size classes between the different levels of the spinal cord (for details, see Table 6).

Table 6. Relative frequency of different sizes of PNX$^+$/nNOS$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	38.9 ± 15.2	43.4 ± 9.3	51.0 ± 3.4	50.9 ± 4.8
M	58.6 ± 15.1	56.1 ± 9.0	47.1 ± 4.6	47.9 ± 5.0
Lg	2.5 ± 3.3	0.5 ± 0.3	1.9 ± 1.2	1.2 ± 1.1

The PNX$^+$/nNOS$^+$ sensory neurons were unevenly dispersed inside the ganglia, and were mainly clustered in the Md (25.6 ± 2.4%) and Cn (25.5 ± 1.4%) regions. The remaining nNOS-containing, PNX$^+$ nerve cells were present in the Cr, Cd and P (19.7 ± 1.4%, 17.3 ± 2.9% and 11.9 ± 0.9%, respectively) domains of the studied DRGs. The distribution pattern of PNX$^+$ and nNOS-containing sensory neurons in the different ganglionic domains is shown in Figure 7c.

2.3.4. PNX$^+$/GAL$^+$ Nerve Cells

The PNX$^+$/GAL-containing cells constituted one of the smaller populations of DRG cells (20.7 ± 5.7%; Figure 6g,h), and were observed in all the studied DRGs from the C, Th, L and S spinal cord levels (constituting 16.1 ± 5.3%, 18.7 ± 7.7%, 22.8 ± 4.9% and 25.5 ± 7.0% of all cells, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX$^+$/GAL$^+$ neurons were observed between the selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

Regarding their diameter, the PNX$^+$/GAL$^+$ DRG cells belonged to only two classes of afferent perikarya: the most numerous subpopulation of Sl-sized cells (99.1 ± 1.3%) and the distinctly less numerous subset of M-sized perikarya (0.9 ± 1.3%); PNX$^+$/GAL$^+$ Lg neurons were not found during the present study. There were no significant differences in the number of DRG neurons representing the different size classes between the different levels of the spinal cord (for details, see Table 7).

Table 7. The relative frequency of different sizes of PNX$^+$/GAL$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	99.3 ± 1.0	97.3 ± 3.3	99.7 ± 0.5	100.0
M	0.7 ± 1.0	2.7 ± 3.3	0.3 ± 0.5	0.0
Lg	0.0	0.0	0.0	0.0

The largest accumulation of PNX$^+$/GAL$^+$ cells was observed in the Cn region of the studied DRGs (31.9 ± 4.1%), while the smallest number of these neurons was found in the P subdomain (9.3 ± 1.9%). The relative frequencies of the PNX$^+$/GAL$^+$ neurons were similar in the Md, Cr and Cd intraganglionic domains (21.6 ± 4.4%, 18.9 ± 0.7% and 18.3 ± 1.9%, respectively). The distribution pattern of PNX$^+$ and GAL-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7d.

2.3.5. PNX$^+$/CRT$^+$ Nerve Cells

A colocalization study of PNX with CRT unveiled the co-occurrence of these two biologically active substances in a small population (10.05 ± 1.6%; Figure 6i,j) of all the DRG cells studied. The PNX$^+$/CRT$^+$ sensory neurons were observed in all the selected DRGs from the C, Th, L and S levels of the spinal cord (constituting 11.2 ± 1.3%, 11.2 ± 4.9%, 10.5 ± 6.0% and 7.3 ± 1.5% of all cells, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX$^+$/CRT$^+$ neurons were observed between the selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

In terms of their diameter, three classes of PNX$^+$/CRT$^+$ DRG neurons were found. The vast majority of these cells were Sl-sized neurons (94.2 ± 6.2%). In addition, a small number of M-sized PNX$^+$/CRT$^+$ sensory nerve cells (5.1 ± 6.3%) were observed, while Lg cells (0.7 ± 0.8%) were only occasionally present in the examined DRGs. While there were no significant differences in the number of PNX$^+$/CRT$^+$ neurons belonging to different size classes in the DRGs of the C, Th and L segments of the spinal cord, large PNX$^+$/CRT$^+$ neurons were not been observed in S DRGs (for details, see Table 8).

Table 8. The relative frequency of different sizes of PNX$^+$/CRT$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	80.3 ± 2.6	98.1 ± 3.3	98.9 ± 1.9	99.5 ± 0.8
M	17.2 ± 2.5	1.8 ± 3.1	1.0 ± 1.7	0.5 ± 0.8
Lg	2.5 ± 4.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0

The PNX$^+$/CRT$^+$ neurons were unevenly distributed between the different intraganglionic domains. The vast majority of PNX$^+$ and CRT-containing sensory nerve cells were found in the Cn domain (33.4 ± 3.8%), while smaller numbers of PNX$^+$/CRT$^+$ neurons were found in the Md, Cr, Cd and P subdomains (18.6 ± 8.1%, 16.7 ± 0.7%, 16.5 ± 0.7% and 14.8 ± 1.4%, respectively). The distribution pattern of the PNX$^+$ and CRT-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7e.

2.3.6. PNX$^+$/PACAP$^+$ Nerve Cells

PACAP was found in 7.4 ± 0.8% (Figure 6k,l) of all PNX-containing neurons and it was present in all the selected DRGs at the C, Th, L and S levels of the spinal cord (7.5 ± 1.8%, 6.4 ± 0.6%, 7.4 ± 2.3% and 8.6 ± 2.2%, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX$^+$/PACAP$^+$ neurons were observed between the selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

In general, PACAP-IR was observed in all three size classes of PNX$^+$ afferent perikarya, being present in 87.2 ± 4.5% of Sl, 12.1 ± 4.0% of M and 0.7 ± 0.6% of Lg cells. It should be stressed that statistically significant differences in the number of Sl- and M-sized PNX/PACAP-containing nerve cells were observed between the C and Th as well as the Th and S levels of the spinal cord. It should also be noted that the large PNX$^+$/PACAP$^+$ sensory neurons were only present in DRGs located in the C level of the spinal cord (see Table 9, Figure 8).

Table 9. Relative frequency of different sizes of PNX$^+$/PACAP$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals); the data were statistically analyzed using the Student's two-tailed *t*-test for unpaired data and using one-way ANOVA with mean values compared using Tukey's multiple comparison test. Asterisks mark statistically significant differences: * $p < 0.05$, ** $p = 0.005$. The results were statistically analyzed using GraphPad PRISM 8.0 software.

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	80.7 ± 7.7 *	94.7 ± 2.1 *; **	90.3 ± 5.6	83.3 ± 2.7 **
M	16.6 ± 5.6 *	5.3 ± 2.1 *; **	9.7 ± 5.6	16.7 ± 2.7 **
Lg	2.7 ± 2.3	0.0	0.0	0.0

The PNX$^+$/PACAP$^+$ sensory neurons were dispersed throughout the ganglia, mainly in its Cn (26.5 ± 2.6%) and Md (21.0 ± 4.1%) regions. The remaining PACAP-containing, PNX$^+$ nerve cells were present in the P, Cr and Cd domains of the studied DRGs (19.5 ± 2.2%, 18.3 ± 7.5% and 14.7 ± 5.1%, respectively). The distribution pattern of the PNX$^+$ and PACAP-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs is shown in Figure 7f.

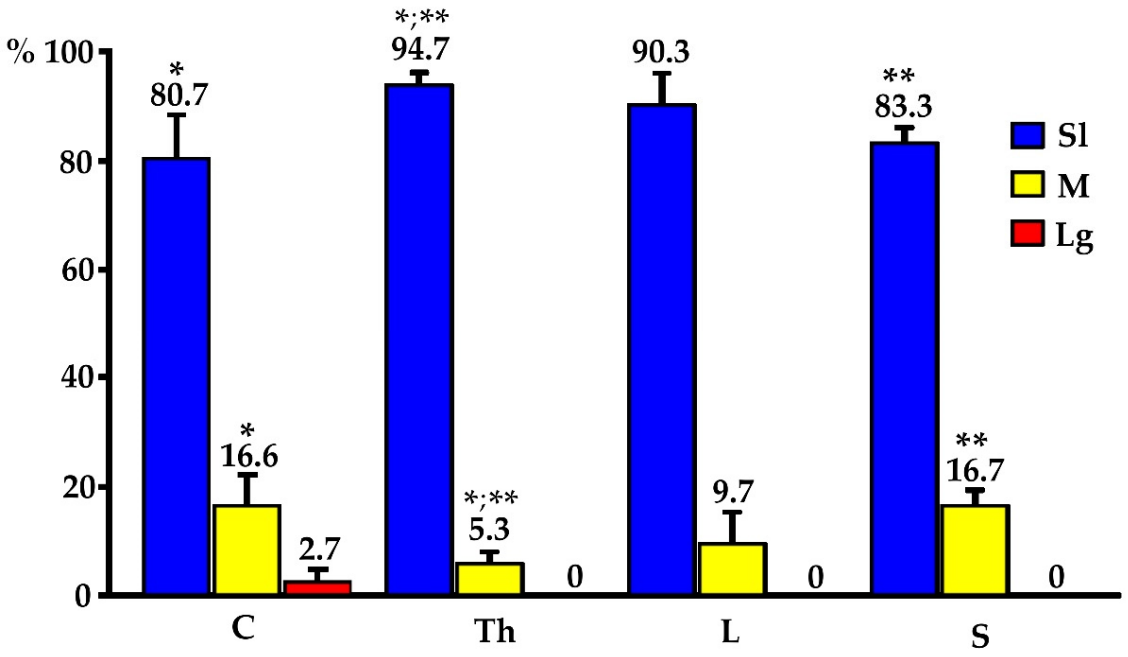


Figure 8. Relative frequency of different sizes of PNX$^+$/PACAP$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals); the data were statistically analyzed using the Student's two-tailed *t*-test for unpaired data and using one-way ANOVA with mean values compared using Tukey's multiple comparison test. Asterisks mark statistically significant differences: * $p < 0.05$, ** $p = 0.005$. The results were statistically analyzed using GraphPad PRISM 8.0 software.

2.3.7. PNX$^+$/CART$^+$ Nerve Cells

Another small population of PNX$^+$ DRG neurons contained CART (5.1 ± 4.1%; Figure 6m,n), and were present in all the selected DRGs from the C, Th, L and S levels of the spinal cord (5.4 ± 4,3%, 4.6 ± 3.6%, 4.9 ± 4.6% and 5.4 ± 5.0%, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX$^+$/CART$^+$ neurons were observed between the selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

In general, CART-IR was observed in all three size classes of afferent perikarya, being present in 55.1 ± 8.6% of M, 44.3 ± 8.6% of Sl and 0.6 ± 11.5% of Lg cells. No significant differences in the size of PNX$^+$/CART$^+$ DRG neurons between different levels of the spinal cord were observed (see Table 10).

Table 10. The relative frequency of different sizes of PNX$^+$/CART$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	20.4 ± 6.2	66.6 ± 2.8	41.1 ± 5.5	49.2 ± 2.7
M	79.6 ± 6.2	33.4 ± 2.8	56.4 ± 1.0	50.8 ± 2.7
Lg	0.0	0.0	2.5 ± 1.4	0.0

Although the PNX$^+$/CART$^+$ sensory neurons were unevenly scattered throughout the individual ganglionic sections, a distinct accumulation of these cells was found in the Cn (31.9 ± 22.02%) ganglionic domains, while a smaller number of PNX$^+$/CART$^+$ sensory neurons was found in the Md, Cd, P and Cr parts (21.5 ± 12.1%, 18.1 ± 4.7%, 15.0 ± 6.4%

and 13.5 ± 12.1%, respectively). The distribution pattern of the PNX$^+$ and CART-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7g.

2.3.8. PNX$^+$/SOM$^+$ Nerve Cells

The SOM-containing sensory neurons constituted the smallest subpopulation (4.7 ± 2.5%; Figure 6o,p) of all PNX$^+$ perikarya, being observed in all the investigated C, Th, L and S DRGs (7.8 ± 6.0%, 6.3 ± 3.5%, 2.8 ± 1.5% and 2.1 ± 0.9%, respectively). No statistically significant differences in the number of PNX$^+$/SOM$^+$ neurons were observed between selected DRGs of a given level of the spinal cord, nor between DRGs from different spinal cord levels.

In terms of their diameter, three classes of the PNX$^+$/SOM$^+$ DRG neurons were observed. The most numerous subpopulation was Sl-sized cells (85.2 ± 9.4%) with a distinctly less numerous subset of M-sized perikarya (14.6 ± 5.3%), while the Lg PNX$^+$/SOM$^+$ neurons (0.2 ± 1.1%) were found sporadically in all the DRGs studied. There were no significant differences in the number of PNX$^+$/SOM$^+$ DRG neurons representing different size classes between the different levels of the spinal cord; however, it should be noted that Lg sensory neurons were not been observed in this subpopulation of PNX$^+$ nerve cells in both the C and S ganglia of the spinal cord (for details, see Table 11).

Table 11. The relative frequency of different sizes of PNX$^+$/SOM$^+$ perikarya found in DRGs of the C, Th, L and S spinal cord segments. The obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD (N = 6 animals).

	Segments of the Spinal Cord (%)			
Size of DRG Cells	**C**	**Th**	**L**	**S**
Sl	82.5 ± 2.1	81.9 ± 2.3	86.9 ± 4.5	89.6 ± 9.0
M	17.5 ± 2.1	17.7 ± 1.7	12.8 ± 2.0	10.4 ± 9.0
Lg	0.0	0.4 ± 0.5	0.3 ± 1.8	0.0

A distinct accumulation of PNX-labeled and SOM$^+$ cells was found in the Cn (28.2 ± 7.1%) and Md ganglionic regions (24.7 ± 2.5%), while these cells were less numerous in the Cr, P and Cd parts of the ganglia (17.0 ± 3.8%, 15.7 ± 8.1% and 14.4 ± 0.7%, respectively). The distribution pattern of the PNX$^+$ and SOM-containing sensory neurons in the different domains of the DRGs are shown in Figure 7h.

3. Discussion

PNX is a newly identified peptide that, in the rat brain, is highly expressed in the hypothalamus, medial division of the central amygdaloid nucleus, the spinal trigeminal tract of the medulla and the spinocerebellar tract [11]. Moreover, enzyme immunoassays also detected a high level of PNX (>4.5 ng/g of tissue) in the spinal cords of rats [5]. Immunohistochemical studies in rat also revealed the presence of PNX in trigeminal ganglia, as well as in ganglia comprising neurons projecting to the superficial layers of the spinal cord, such as the DRGs and nodose ganglia [5]. These projections may belong to Aδ-terminals—thin, myelinated fibers capable of responding to both thermal and mechanical stimuli—or to C-fibers, which are unmyelinated, slow-conducting axons that can, due to their high activation threshold, detect painful stimuli. Both of these types of NFs are assigned to nociceptors as they respond to destructive, thermal, mechanical or chemical stimuli [12]. Furthermore, PNX$^+$ afferent NFs targeting the spinal cord were revealed in mice and pigs and were present in all spinal cord segments at equal levels [6,13], whereas PNX was observed mainly in NFs located in the superficial DH layer, in laminae I and II [5,6]. It is also worth noting that PNX-IR NFs participate in skin innervation in rodents: subcutaneous injections of the fluorescent retrograde tracer Fluorogold labeled a population of DRG cells, some of which also contained PNX, thus raising the possibility that PNX

released from these terminals could affect other sensory NF/sensory signaling pattern from the skin to the spinal cord [13].

In addition, the presence of "true" PNX was confirmed by the use of mass spectrometry (not only by showing that the major peak corresponds to the peptide, but also by verifying its presence using the fragmentation spectra of its individual amino acids) in the extracts of DRG cells (present study) as well as in the spinal cord (both rat [5] and mouse [13]).

The available literature implicates PNX in pain transmission, and it has been found that the intrathecal injection of amidated PNX suppresses visceral pain; however, it did not affect thermal pain sensation [5]. Moreover, PNX's contribution to sensory modulation is also supported by its participation in inducing the itching effect, as revealed in a study by Cowan and colleagues [13].

To date, the presence of PNX in DRG neurons has only been studied in rodents [5,13]. Thus, for the first time, our study demonstrated the presence of PNX in afferent neurons of porcine DRGs. We have found that PNX^+ neurons accounted for a relatively large subpopulation (approximately 20% of all cells) in all DRGs of each segment of the spinal cord. Furthermore, considering the differences in the size (diameter) of the PNX-containing cells, it was demonstrated that the vast majority of PNX-IR neurons were Sl-sized neurons (average diameter up to 40 µm). M-sized cells (40–70 µm) were distinctly less numerous, while Lg PNX^+ cells (diameter > 71 µm) were only occasionally observed. This finding appears to be inconsistent with the previous results described in rodents, where many of the PNX^+ neurons belonged to the M-sized DRG perikarya [5]. As there is a consensus that the size of the sensory cell is associated with different "physiological functional classes", the data presented above may suggest a different involvement of PNX-positive cells in sensory modalities in rodents and the domestic pig. However, this hypothesis requires further verification.

The present study, for the first time, also focused on the immunohistochemical characteristics of PNX^+ DRG neurons. We examined PNX colocalization patterns with several neurotransmitters/their markers that were previously revealed in DRG neurons, with particular attention to those biologically active molecules that were previously described in Sl- and/or M-diameter afferent cells: CGRP, SP, nNOS, GAL, CRT, PACAP, CART and SOM [14,15].

Previous studies revealed that, CGRP, together with SP (see below), appears to be the "canonical" transmission molecule of afferent neurons in all mammalian species studied so far (human, horse, dromedary camel, pig, cat, rat and mouse) [16–20]. According to the available data, the proportion of sensory neurons containing CGRP (or expressing mRNA encoding this peptide [21,22]) ranging, on average, between 50 and 60% of all DRG cells, regardless of the species studied. Furthermore, their axonal processes constitute the largest population of nerve fibers forming not only individual laminae of the dorsal horns of the spinal cord (especially laminae I-III, V and X), but also Lissauer's tract [17]. Interestingly, this pattern of intraspinal distribution of CGRP-positive central projections of DRG cells persists in all spinal cord neuromeres, which is most prominent in the thoracic ones [16].

In addition to being involved in the conduction of sensory and pain stimuli in a wide variety of mammals, including human [17,18,23–25], CGRP is also known to be a very potent vasodilator [26] and a deficiency in CGRP release is related to a lack of a vasodilation reflex [27]; thus, blockade of CGRP secretion exerts an analgesic effect in people suffering from migraine [28].

However, CGRP, along with SP, released from the terminals of DRG neurons in response to noxious mechanical, chemical or thermal stimuli [29] may also contribute to the development and maintenance of neurogenic inflammation: CGRP acts as an extremely potent vasodilator [30] while SP, acting on neurokinin 1 (NK1) receptors, evokes increased vascular permeability [31]. Therefore, it can be concluded that the intensified secretion of these peptides may contribute to the formation of edema, increased blood flow and the influx of inflammatory cells at the site of inflammation.

The above-mentioned close interdependence and cooperation of CGRP and SP in numerous regulatory loops seem to result from the fact that both substances coexist very often in the same sensor cell [14,17,20] from which they are released together and synergistically interact with target cells, supporting each other. For example, as revealed by Biella and co-workers [32], the excitatory effects of SP arising from spontaneous and noxious activity were significantly enhanced by CGRP in rats. Although the mechanism by which CGRP may potentiate the effects of SP is not fully clear, there is evidence that CGRP may delay the enzymatic degradation of SP [33,34]. CGRP has also been reported to increase the release of SP [35] as well as the excitatory amino acid transmitters glutamate and aspartate [36] from central terminals of DRG neurons, possibly leading to the strengthening of synaptic connections in the spinal dorsal horn, as well as increasing the effectiveness of these substances on the peripheral targets (for details, see [37]).

The second largest population of PNX$^+$ DRG cells observed in this study were SP-containing neurons, accounting for approximately 89% of all PNX$^+$ afferent cells. This observation seems to be in stark contrast to the data obtained in studies of the co-occurrence of PNX and SP in mouse DRG cells, where both neurotransmitters were present in separate cell subpopulations [5]. Therefore, it seems reasonable to hypothesize that PNX is probably involved in regulating different functions of DRG sensory cells in both species.

As shortly mentioned above, SP, like CGRP, is primarily considered a transmitter of sensory and pain stimuli, the presence of which has been shown in DRG cells in every species studied so far, including humans [38–41]. So far, studies on the presence and distribution patterns of SP$^+$ cells in the DRGs of the domestic pig have shown the presence of cells containing this tachykinin, especially in subpopulations of Sl- and M-sized neurons. Moreover, there is irrefutable evidence that SP occurs in both the somatic as well as visceral subclasses of these perikarya [14,42]. This is consistent with the data obtained in other species studied so far, including humans [21], guinea pigs [39], mice [5] and rats [43,44], with regard to both the number of chemically encoded afferent cells and their classification into individual size classes.

While the co-existence of PNX with CGRP in the studied porcine DRG cells was shown in a very high percentage of cells (approximately 96% of all PNX$^+$ cells), only slightly more than half of the CGRP$^+$ cells (56%) also contained PNX. Moreover, a very similar picture emerged from the studies on the co-occurrence pattern of PNX and SP performed in this study: almost 90% (exactly 88.5%) of all PNX$^+$ cells contained SP, and approximately 50% of all SP$^+$ cells were also PNX-positive. The co-localization of both peptides was observed mainly in Sl- and M-sized ganglion cells.

Thus, based on the comparison of the relative numbers of DRG cells containing the individual transmitters, there is no mathematical possibility that all three peptides do not co-occur in at least approximately 80–85% of all PNX$^+$ cells. This suggestion is further, although indirectly, supported by the observation of the high degree of co-occurrence of PNX with SP and/or CGRP in the axonal fibers of DRG cells forming the dorsal horn laminae of the porcine spinal cord [6].

Moreover, considering the degree of co-localization of PNX and nNOS in DRG cells (approximately 50% of all PNX$^+$ cells; see below), it seems that neurons containing all four transmitting substances must also be present in at least 30% of all the porcine DRG cells. Unfortunately, at present, insufficient knowledge of the possible functions of PNX in peripheral sensory pathways prevents us from suggesting its physiological significance, either in the case of hypothetical PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$ cells or in the population of cells additionally co-expressing nNOS.

nNOS is a marker of the nitrergic subpopulation of afferent cells that are involved in the regulation of numerous physiological processes in the peripheral and central nervous systems. Nitric oxide (NO), produced by nNOS, is an important neurotransmitter in the periphery, mainly in the control of, among others, neuronal plasticity [45], neurogenesis [46], neuroprotection [47] as well as modulation of nociceptive transmission in neuropathic

pain [48] and it is believed that inhibition of nNOS may be a valuable strategy in the treatment of not only neuropathic pain [49] but also several other illnesses [50].

In the present study, PNX^+/nNOS-containing neurons formed the third largest (approximately 50%) population among all afferent cells capable of synthesizing and releasing PNX as their transmitter; the vast majority of these neurons were Sl- and M-sized cells. This is well in line with the data obtained in other species (humans, rats, mice, sheep, dromedary camels [20,51–53]) where nitrergic afferent neurons were found in an average of 40–50% of all DRG cells, with the highest percentage in the subpopulation of Sl- and M-sized neurons. It should be emphasized that the high degree of nNOS co-localization with SP and CGRP, reported by Russo and colleagues [53], additionally supports the above hypothesis, suggesting the existence of a $PNX^+/SP^+/CGRP^+/NOS^+$ population of DRG cells.

The co-existence of PNX and GAL was found exclusively in porcine DRGs in approximately one-fifth (20.7%) of Sl-sized neurons. As neither the immunoreactivity to GAL alone nor the co-occurrence of PNX and GAL immunoreactivities was observed in M- or Lg-sized cells, this strongly suggests the involvement of cells containing these two peptides in the regulation of nociceptive activities in the domestic pig. This suggestion corresponds well with the data from studies in other species, especially rats: GAL was also found in Sl-sized DRG cells in rodents (in a few cells [54]) and humans (approximately 12% [22]); moreover, it has also been observed that their number increases dramatically after peripheral nerve damage [55,56]. Numerous studies indicate that GAL may reduce the perception and transmission of pain by increasing the pain threshold as a result of increasing K^+ conductance or decreasing Ca^{2+} conductance in the brain, spinal cord and peripheral neurons [57,58]. Moreover, in behavioral studies, it was found that reducing the effect of GAL leads to an increase in neuropathic pain-like behaviors and, on the contrary, the upregulation of GAL leads to a decrease in neuropathic pain in animal models [56].

In contrast to its co-occurrence pattern with CGRP, SP or GAL, PNX co-localized with the other studied substances (neuropeptides: PACAP, CART and SOM; calcium-binding protein: CRT) in only a relatively few porcine DRG cells.

In the case of the co-occurrence of PNX and PACAP, a significantly lower degree of colocalization was observed in this study (about 7% of all PNX^+ cells simultaneously contained PACAP); at the same time, however, it should be emphasized that the vast majority of neurons chemically coded by the presence of both peptides belonged to the population of small, probably nociceptive, neurons. These observations agree fairly well with the data obtained in rodents, where $PACAP^+$ cells were part of a Sl-diameter neuronal population [59,60]. It should be noted, however, that the number of $PACAP^+$ cells in rat DRGs was slightly higher, reaching approximately 10–17.5% of all sensory nerve cells [61], suggesting interspecies differences.

It is worth noting that both PACAP and GAL are dramatically up-regulated in damaged DRG cells (up to 75% in the rat [60]), especially in Sl-sized cells (probably nociceptive perikarya), and act as neuroprotective and/or pro-regenerative peptides in this scenario [62–64]. Unfortunately, so far, there are no data on the possible functions of PNX in these regulatory mechanisms, and therefore the question of the possible existence of a subpopulation of $PNX^+/GAL^+/PACAP^+$ cells, as well as their presumed targets and possible regulatory functions remains open and requires further, more detailed research.

In contrast to the patterns of PNX co-localization with the other biologically active agents discussed above, where the vast majority of observed PNX^+ cells belonged almost exclusively to Sl- or M-diameter cells, PNX and CART co-localization was observed in the pig in all three neuronal size classes, with the M-sized $PNX^+/CART^+$ cells being the most numerous. While the data on the presence of CART in porcine DRG cells collected in this study appear to be in full agreement with the results obtained by Zacharko-Siembida and colleagues [65] in the lumbar porcine DRGs (in both studies, the relative number of CART+ cells oscillated around 5% of all DRG cells), a slightly more numerous (approximately 10%) population was observed in rodents [66]. Remarkably, Zacharko-Siembida and colleagues

found that the vast majority (approximately 70%) of porcine CART$^+$ DRG cells simultaneously contain CGRP. This allows for the assumption that some of the sensory cells may also contain, in addition to PNX$^+$/CGRP$^+$/SP$^+$/NOS$^+$, CART, which additionally suggests the need for in-depth research on both the chemistry and the functional significance of these sensory cells.

The last of the neuropeptides whose pattern of co-occurrence with PNX was the subject of interest in this work was SOM, a substance present in both the pig and the rat [67] in a small (up to 10%) subpopulation of the DRG cells. It has been shown that a small fraction (about 6% of all PNX$^+$ cells) also contains SOM, which, in the light of the available literature data (both PNX and SOM are implicated as transmitters subserving the itch conduction pathway [13,68,69]) the most recent data, see [70], suggests that these cells are representatives of pruriceptors. However, further studies are needed to unveil the exact relevance of PNX in this neural modality.

Intracellular calcium-binding proteins may play an important role in the nociceptive excitability of neurons [71,72], as well as in proprioception [73], as evidenced by the presence of calbindin (CB) in excitatory interneurons within the superficial DH [74]. Taking this into account, we decided to analyze the co-occurrence of CRT (protein closely related to the above-mentioned CB) with PNX in porcine primary afferent cells. It was found that PNX coexisted with CRT in a relatively small population of DRG neurons (approximately 10.5% of all PNX-containing cells), due to the fact that CRT was expressed mainly in Lg-sized neurons, and the vast majority of PNX$^+$ neurons were small-sized cells. These data are in line with reports emerging from studies concerning the CB or CRT expression patterns in rats and fowl [15,73,75], which showed that the vast majority of CB- or CRT-positive neurons were M to Lg in size [73].

Limitations of the Study

The most important limitation of the present study was the inability to perform simultaneous colocalization studies of a larger number of neurotransmitters in the same nerve cell, due to the unavailability of appropriate primary and/or secondary antibodies. Similarly, the authors are aware that the value of this work would be higher if it were possible to demonstrate expression patterns of membrane/cytosolic receptor subtypes specific to the studied neurotransmitters; unfortunately, as in the case of studies based on multiple colocalizations in a single afferent cell, the unavailability of antibodies recognizing the mentioned receptors was an obstacle. The last limitation was the inability to link the observed PNX$^+$ cell subtypes with their target tissues within the assumptions of this study: an analysis of the presence of PNX$^+$ cells in the DRGs of so many spinal cord neuromeres would require the injection of a retrograde neuronal tracer into individual internal organs in such a large number that the planned experiment was simply becoming impossible. On the other hand, the use of an anterograde tracing technique was excluded due to the need to inject the tracer directly into the studied DRG, which would certainly cause changes in the expression pattern(s) of the tested substances.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Animals

The investigations were performed on 6 juvenile female pigs (8–12 weeks old, 15–20 kg body weight—b.w.) of the Large White Polish breed. The animals were kept under standard laboratory conditions. They were fed standard fodder (Grower Plus, Wipasz, Wadąg, Poland) and had free access to water. All surgical procedures were performed following the rules of the local Ethics Commission (affiliated with the National Ethics Commission for Animal Experimentation, Polish Ministry of Science and Higher Education; decision No. 40/2020 from 22 July 2020).

4.2. Surgical Procedures

All animals were pretreated with atropine (Polfa, Warsaw, Poland; 0.05 mg/kg b.w., subcutaneous (s.c.) injection) and azaperone (Stresnil, Janssen Pharmaceutica, Belgium; 2.5 mg/kg b.w., intramuscular (i.m) injection) and after thirty minutes, they were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (Tiopental, Sandoz, Poland; 0.5 g per animal, administered according to the effect). The 5th lumbar DRGs (L5) were collected intraoperatively from 3 out of 6 pigs, and they were used for PNX identification using mass spectroscopy (MS). Next, the anesthesia was deepened, and after cessation of breathing, all the animals were transcardially perfused with freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Whole spinal cords, including the attached DRGs, were gently dissected, sectioned into individual neuromeres (assuming the anatomical extent of their *fila radicularia* as boundaries) and each neuromere was fixed in the same fixative (10 min at room temperature), washed several times in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4; 4 °C; twice daily for three days) and stored in 18% buffered sucrose at 4 °C (for two weeks) until sectioned.

4.3. Protein Extraction

The proteomics analysis of the DRGs was performed at the Mass Spectrometry Laboratory at the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences. The tissue was transferred to 2 mL tubes containing a mix of 1.4 mm, 2.8 mm and 5.0 mm zirconium oxide beads. The lysis was performed in 500 µL of 25% trifluoroethanol (TFE) in 100 mM triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB). The tissue was lysed using a Precellys Evolution homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) using 6 rounds of a program with the following parameters: 10 cycles of 6800 rpm for 60 s with a 20 s pause in between. Homogenization was performed at 4 °C with dry ice cooling. After lysis, the samples were centrifuged (14,000× *g*, 30 min, 4 °C) and transferred to 1.5 mL tubes with low retention. Cysteine residues were reduced by incubation with 10 mM Tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) for 60 min, followed by blocking with 25 mM chloroacetamide. A 100 µL volume of the lysate was diluted to 500 µL with a 10% aqueous solution of acetonitrile (ACN), vortexed and briefly spun to remove the precipitated proteins. The sample was transferred to a 30 kDa cut-off filter (Vivacon 500, Sartorius, Göttingen, Germany). After centrifugation (14,000× *g*, 2 h, 25 °C), the filtrate was transferred to a new Eppendorf tube, dried in a SpeedVac and reconstituted in 40 µL of 0.1% formic acid.

4.4. Mass Spectroscopy (MS)

The samples were analyzed using a liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) system composed of Evosep One (Evosep Biosystems, Odense, Denmark) coupled to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). A 20 µL volume of the sample was loaded onto disposable Evotips C18 trap columns as described previously [11]. Chromatography was carried out at a flow rate of 250 nl/min using the 88 min (15 samples per day) preformed gradient on N EV1106 analytical column (Dr Maisch C18 AQ, 1.9 µm beads, 150 µm ID, 15 cm long; Evosep Biosystems, Odense, Denmark). Data were acquired in positive mode with a data-dependent method using the following parameters: MS1 resolution was set at 120 000 with a 500% normalized automatic gain control (AGC) target, auto maximum inject time and a scan range of 250 to 1200 m/z; cycle time was set to 1 s. The ions with an m/z corresponding to the PNX protein with amidation within 1.6 m/z window were subjected to fragmentation with a normalized collision energy of 30%. For MS2, the resolution was set at 30,000 with a 1000% normalized AGC target and auto maximum inject time. The spray voltage was set at 2.1 kV, the funnel radio frequency (RF) level at 40, and the heated capillary temperature at 275 °C.

4.5. MS Data Analysis

Protein identification was performed using the Proteome Discoverer software suite (version 2.4.0.305) and the Sus scrofa full Uniprot database (version 2022_02). The search

included non-cleaved proteins, Carboamidomethylation (C) was set as a fixed modification and Oxidation (M) and Amidation on Protein C-term were set as a variable ones. Fixed Value PSM (peptide-spectra match) Validator was used for PSM validation. At the consensus step, the basic Proteome Discoverer settings were used.

4.6. Sectioning of the Tissue Samples

Three representative DRGs from each level of the spinal cord were selected for this study. Bilateral DRGs from cervical (C: C1, C4, C7), thoracic (Th: Th1, Th7, Th15), lumbar (L: L1, L3, L6) and sacral (S: S1, S3) neuromeres were located pairwise on a pre-cooled block of the optimal cutting temperature compound medium (OCT) in a manner that allowed for the easy determination of the position of individual subdomains of the DRG sections under a microscope. Frozen ganglia were cut with an HM525 Zeiss freezing microtome into transverse 10 µm thick serial sections (four sections on each slide) and mounted on chrome alum–gelatine-coated slides.

4.7. Immunohistochemical Procedure and Estimation of the Total Number of PNX-Containing DRG Neurons

Serial 10 µm thick DRG sections were processed for double-labeling immunofluorescence (following a previously described protocol [14]) using combinations of primary immunosera raised in different species. After immersion of the tissues in a blocking solution containing 0.1% bovine serum albumin, 1% Triton X 100, 0.01% sodium azide (NaN_3), 0.05% thimerosal and 10% normal goat serum in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature to reduce non-specific background staining, the sections were repeatedly rinsed in PBS, and then incubated overnight at room temperature with PNX antiserum applied in a mixture with antisera against: CART, CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, SOM and SP. A combination of antisera against PNX and protein gene product 9.5 (PGP 9.5) was used to accurately determine the distribution pattern and the total number of PNX cells in the right and left DRGs from the different levels of the spinal cord (C, Th, L and S). Primary antisera were visualized by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat, guinea pig or mouse immunoglobulin G (IgG)-specific secondary antisera or streptavidin (CY3) rabbit-specific antiserum (Table 12). After rinsing the tissue with PBS, Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA, F4680) was applied to the section and then the tissue was covered with a coverslip.

PNX/PGP 9.5-positive perikarya were counted in every fourth section of six slides per DRG studied, while the colocalization of PNX with other biologically active substances was assessed from three slides (one section on the given slide for colocalization experiment) taken symmetrically from each one-third (anterior, middle, posterior; total = 9 slides) of each DRG studied: C (C1, C4, C7), Th (Th1, Th7, Th15), L (L1, L3, L6) and S (S1, S3). While the number of DRG cells belonging to specific neuronal subpopulations was manually counted within the entire section of the ganglion being assessed (only neuronal profiles in which the cell nucleus was clearly visible were counted), the diameters of PNX-positive (PNX^+) perikarya were measured using a subroutine of the image analysis software (AnalySIS version 3.0, Soft Imaging System GmbH, Germany). The neurons were divided into three size classes: Sl (average diameter up to 40 µm), M (diameter 41–70 µm) and Lg (diameter $\geq$ 71 µm). To determine the relative frequency of the appropriately chemically coded subpopulation of the studied sensory neurons, all profiles of cells containing, for example, CGRP (visualized with FITC-labeled secondary antibody) and PNX (visualized with CY3-labeled secondary biotinylated antibody) were counted within the examined DRG section. The correctness of the assessment was confirmed using a special filter allowing the simultaneous observation of FITC and CY3 excitation. The combinations of primary antibodies employed in this study for double labeling are presented in Table 13.

Table 12. List of primary antisera and secondary reagents used in the study: CART, CGRP, CRT, GAL, nNOS, PACAP, protein gene product 9.5 (PGP 9.5), PNX, SOM, SP, FITC, CY3.

Antigen	Code	Dilution	Host	Supplier
Primary antibodies				
CART	MAB 163	1:1000	Mouse	R&D Systems, Wiesbaden, Germany
CGRP	T-5027	1:800	Guinea pig	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
CRT	6B3	1:2000	Mouse	SWANT, Burgdorf, Switzerland
GAL	T-5036	1:1500	Guinea pig	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
nNOS	N2280	1:200	Mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PACAP	T-5039	1:1000	Guinea pig	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
PGP 9.5	7863-2004	1:5000	Mouse	Biogenesis, Poole, UK,
PNX	H-079-01	1:7000	Rabbit	Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA,
SOM	MAB 354	1:50	Rat	Merck Millipore, Temecula, CA, USA
SP	8450-0004	1:200	Rat	Bio-Rad, Kidlington, UK
Secondary reagents				
CY3-conjugated anti-rabbit	711-166-152	1:700	Donkey	Jackson I.R.; West Grove, PA, USA, Baltimore Pike
FITC-conjugated anti-mouse IgG	715-096-151	1:800	Donkey	Jackson I.R.; West Grove, PA, USA, Baltimore Pike
FITC-conjugated anti-guinea pig IgG	706-095-148	1:800	Donkey	Jackson I.R.; West Grove, PA, USA, Baltimore Pike
FITC-conjugated anti-rat IgG	712-095-153	1:400	Donkey	Jackson I.R.; West Grove, PA, USA, Baltimore Pike

Table 13. Double staining combinations employed in this study.

Primary Antibody	Primary Antibody	Secondary Antibody
PNX (rabbit)	CART (mouse)	CY3 (rabbit), FITC (mouse)
PNX (rabbit)	CGRP (guinea pig)	CY3 (rabbit), FITC (guinea pig)
PNX (rabbit)	CRT (mouse)	CY3 (rabbit), FITC (mouse)
PNX (rabbit)	GAL (guinea pig)	CY3 (rabbit), FITC (guinea pig)
PNX (rabbit)	nNOS (mouse)	CY3 (rabbit), FITC (mouse)
PNX (rabbit)	PACAP (guinea pig)	CY3 (rabbit), FITC (guinea pig)
PNX (rabbit)	PGP (mouse)	CY3 (rabbit), FITC (mouse)
PNX (rabbit)	SOM (rat)	CY3 (rabbit), FITC (rat)
PNX (rabbit)	SP (rat)	CY3 (rabbit), FITC (rat)

The labeled sections were viewed using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with an appropriate filter set for CY3 and FITC. Micrographs were taken using an Olympus XM10 digital camera (Tokyo, Japan). The microscope was equipped with cellSens Dimension 1.7 Image Processing software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Finally, the obtained data were pooled for each animal and are presented as mean ± SD and were statistically analyzed using the Student's two-tailed *t*-test for unpaired data and one-way ANOVA with mean values compared using Tukey's multiple comparison test. The results were statistically analyzed using GraphPad PRISM 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

4.8. Control of Specificity of Immunohistochemical Procedures

Standard controls, i.e., preabsorption for the neuropeptide antisera (20 µg of appropriate antigen per 1 mL of the corresponding antibody at working dilution; all antigens were purchased from Peninsula (San Carlos, CA, USA), R&D Systems (Wiesbaden, Germany), SWANT (Burgdorf, Switzerland), Sigma, Phoenix (Burlingame, CA, USA)—Table 14), as well as omission and replacement of the respective primary antiserum with the correspond-

ing non-immune serum completely abolished immunofluorescence and eliminated the specific staining. Photos showing the preabsorption controls are presented in Figure 9.

Table 14. List of antigens used in pre-absorption test.

Antigen	Code	Dilution	Supplier
CART	MAB0041	1:1000	R&D Systems, Germany
CGRP	T-4030	1:800	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
CRT	6-His human calretinin (recombinant) Lot No.: 22	1:2000	SWANT, Switzerland
GAL	T-4862	1:1500	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA
nNOS	N3033	1:200	Sigma, St. Louis, MO, USA
PACAP	A9808	1:1000	Sigma, St. Louis, MO, USA
PNX	079-01	1:7000	Phoenix Pharmaceuticals Inc.; Burlingame; Kalifornia; San Carlos, CA, USA
SOM	S9129	1:50	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SP	S6883	1:200	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

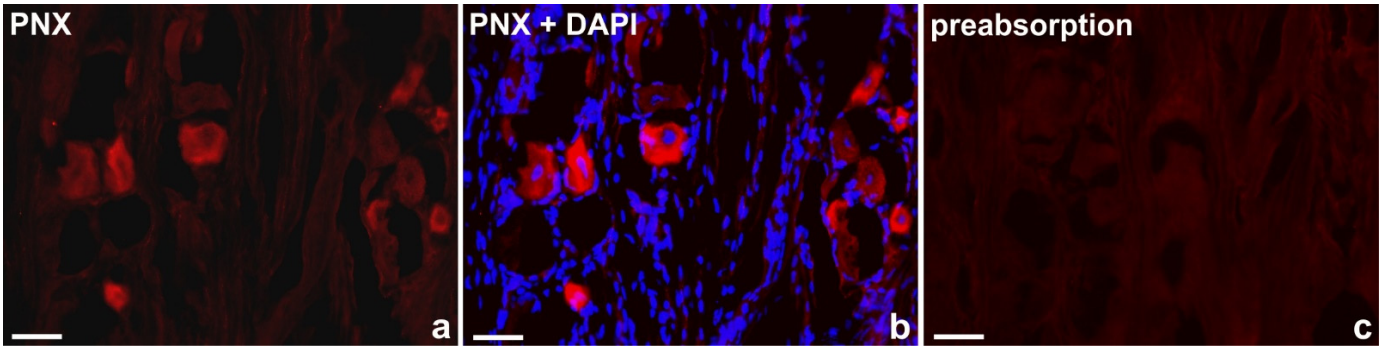


Figure 9. Representative examples of the immunofluorescence staining specificity control procedures used in the study: (**a**) "classical" staining with anti-PNX antibody, visualized by CY3, (**b**) anti-PNX antibody + 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a counterstain, (**c**) antiserum anti-PNX antibody preabsorbed with PNX amide. Scale bar: 50 µm.

5. Conclusions

In summary, our research is the second work to show the location of PNX in DRGs, and the first performed in a large mammal (pig). Moreover, we have revealed the coexistence pattern(s) of PNX with a plethora of other neurotransmitters in the examined nerve cells, suggesting the existence of multiple transmitters using DRG cells (i.e., PNX/CGRP/SP/NOS/CART), that may, most probably, be involved in the control of blood vessel tone, maintenance/regulation of neurogenic inflammation process, as well as in the conveyance of itching sensations. These data may be helpful in better understanding the functional role of PNX in transmitting various types of sensory information and its possible impact on the functioning of many organs in the body. Additionally, the presented data indicate that PNX-IR appears in a heterogeneous group of sensory ganglion cells, from small to large, suggesting that this peptide can be subordinated to different sensory modalities.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms242316647/s1.

Author Contributions: Conceptualization, A.B. and M.K.M.; methodology, A.B.; validation, A.B. and E.Ł.-B.; surgical procedures, A.B., E.L. and M.K.M.; formal analysis, U.M. and A.B.; investigation, U.M. and P.J.; resources, U.M. and A.B.; writing—original draft preparation, U.M. and A.B.; writing—review and editing, A.B., E.L. and M.K.M.; visualization, U.M., E.L. and E.Ł.-B.; supervision, A.B.; project administration, U.M. and A.B.; funding acquisition, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Agnieszka Bossowska was the recipient of the Statutory Fund of the School of Medicine, Collegium Medicum (61.610.008-110), University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation in Olsztyn, Poland (affiliated with the National Ethics Committee for Animal Experimentation, Polish Ministry of Science and Higher Education; decision No. 40/2020 from 22 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Yosten, G.L.C.; Lyu, R.M.; Hsueh, A.J.W.; Avsian-Kretchmer, O.; Chang, J.K.; Tullock, C.W.; Dun, S.L.; Dun, N.; Samson, W.K. A Novel Reproductive Peptide, Phoenixin. *J. Neuroendocr.* **2013**, *25*, 206–215. [CrossRef] [PubMed]
2. Treen, A.K.; Luo, V.; Belsham, D.D. Phoenixin Activates Immortalized GnRH and Kisspeptin Neurons through the Novel Receptor GPR173. *Mol. Endocrinol.* **2016**, *30*, 872–888. [CrossRef] [PubMed]
3. McIlwraith, E.K.; Zhang, N.; Belsham, D.D. The Regulation of Phoenixin: A Fascinating Multidimensional Peptide. *J. Endocr. Soc.* **2022**, *6*, bvab192. [CrossRef] [PubMed]
4. Liang, H.; Zhao, Q.; Lv, S.; Ji, X. Regulation and Physiological Functions of Phoenixin. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 956500. [CrossRef] [PubMed]
5. Lyu, R.M.; Huang, X.F.; Zhang, Y.; Dun, S.L.; Luo, J.J.; Chang, J.K.; Dun, N.J. Phoenixin: A Novel Peptide in Rodent Sensory Ganglia. *Neuroscience* **2013**, *250*, 622–631. [CrossRef]
6. Lepiarczyk, E.; Bossowska, A.; Majewska, M.; Skowrońska, A.; Kaleczyc, J.; Majewski, M. Distribution and Chemical Coding of Phoenixin-Immunoreactive Nerve Structures in the Spinal Cord of the Pig. *Ann. Anat.* **2020**, *232*, 151559. [CrossRef]
7. Dalmose, A.L.; Hvistendahl, J.J.; Olsen, L.H.; Eskild-Jensen, A.; Djurhuus, J.C.; Swindle, M.M. Surgically Induced Urologic Models in Swine. *J. Investig. Surg.* **2000**, *13*, 133–145. [CrossRef]
8. Kuzmuk, K.N.; Schook, L.B. Pigs as a Model for Biomedical Sciences. In *The Genetics of the Pig*, 2nd ed.; CABI: Wallingford, UK, 2011; pp. 426–444. [CrossRef]
9. Swindle, M.M.; Makin, A.; Herron, A.J.; Clubb, F.J.; Frazier, K.S. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet. Pathol.* **2012**, *49*, 344–356. [CrossRef]
10. Gromadziński, L.; Skowrońska, A.; Holak, P.; Smoliński, M.; Lepiarczyk, E.; Żurada, A.; Majewski, M.K.; Skowroński, M.T.; Majewska, M. A New Experimental Porcine Model of Venous Thromboembolism. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1862. [CrossRef]
11. Prinz, P.; Scharner, S.; Friedrich, T.; Schalla, M.; Goebel-Stengel, M.; Rose, M.; Stengel, A. Central and Peripheral Expression Sites of Phoenixin-14 Immunoreactivity in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 195–201. [CrossRef]
12. D'Mello, R.; Dickenson, A.H. Spinal Cord Mechanisms of Pain. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *101*, 8–16. [CrossRef]
13. Cowan, A.; Lyu, R.M.; Chen, Y.H.; Dun, S.L.; Chang, J.K.; Dun, N.J. Phoenixin: A Candidate Pruritogen in the Mouse. *Neuroscience* **2015**, *310*, 541–548. [CrossRef]
14. Bossowska, A.; Crayton, R.; Radziszewski, P.; Kmiec, Z.; Majewski, M. Distribution and Neurochemical Characterization of Sensory Dorsal Root Ganglia Neurons Supplying Porcine Urinary Bladder. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60* (Suppl. S4), 77–81.
15. Cheng, X.; Xiao, F.; Xie, R.; Hu, H.; Wan, Y. Alternate Thermal Stimulation Ameliorates Thermal Sensitivity and Modulates Calbindin-D 28K Expression in Lamina I and II and Dorsal Root Ganglia in a Mouse Spinal Cord Contusion Injury Model. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21173. [CrossRef]
16. Cervero, F.; Iggo, A. The substantia gelatinosa of the spinal cord: A critical review. *Brain* **1980**, *103*, 717–772. [CrossRef] [PubMed]
17. Gibson, S.J.; Polak, J.M.; Bloom, S.R.; Sabate, P.M.; Mulderry, P.M.; Ghatei, M.A.; Mcgregor, G.P.; Morrison, J.F.B.; Kelly, J.S.; Evans, R.M.; et al. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J. Neurosci.* **1984**, *4*, 3101–3111. [CrossRef]
18. Nordlind, K.; Eriksson, L.; Seiger, Å.; Bakhiet, M. Expression of Interleukin-6 in Human Dorsal Root Ganglion Cells. *Neurosci. Lett.* **2000**, *280*, 139–142. [CrossRef] [PubMed]
19. Nakamura, K.; Ajijola, O.A.; Aliotta, E.; Armour, J.A.; Ardell, J.L.; Shivkumar, K. Pathological effects of chronic myocardial infarction on peripheral neurons mediating cardiac neurotransmission. *Auton. Neurosci.* **2016**, *197*, 34–40. [CrossRef] [PubMed]
20. Javed, H.; Rehmathulla, S.; Tariq, S.; Ali, M.A.; Emerald, B.S.; Shehab, S. Co-Localization of Nociceptive Markers in the Lumbar Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord of Dromedary Camel. *J. Comp. Neurol.* **2021**, *529*, 3710–3725. [CrossRef]
21. Giaid, A.; Gibson, S.J.; Ibrahim, N.B.N.; Legon, S.; Bloom, S.R.; Yanagisawa, M.; Masaki, T.; Varndell, I.M.; Polak, J.M. Endothelin 1, an Endothelium-Derived Peptide, Is Expressed in Neurons of the Human Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7634–7638. [CrossRef] [PubMed]

22. Landry, M.; Åman, K.; Dostrovsky, J.; Lozano, A.M.; Carlstedt, T.; Spenger, C.; Josephson, A.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T. Galanin Expression in Adult Human Dorsal Root Ganglion Neurons: Initial Observations. *Neuroscience* **2003**, *117*, 795–809. [CrossRef]
23. Merighi, A.; Kar, S.; Gibson, S.J.; Ghidella, S.; Gobetto, A.; Peirone, S.M.; Polak, J.M. The Immunocytochemical Distribution of Seven Peptides in the Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia of Horse and Pig. *Anat. Embryol.* **1990**, *181*, 271–280. [CrossRef] [PubMed]
24. Iyengar, S.; Johnson, K.W.; Ossipov, M.H.; Aurora, S.K. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache* **2019**, *59*, 659–681. [CrossRef]
25. Dodds, K.N.; Kyloh, M.A.; Travis, L.; Cox, M.; Hibberd, T.J.; Spencer, N.J. Anatomical Distribution of CGRP-Containing Lumbosacral Spinal Afferent Neurons in the Mouse Uterine Horn. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 1012329. [CrossRef]
26. Brain, S.D.; Tippins, J.R.; Morris, H.R.; MacIntyre, I.; Williams, T.J. Potent Vasodilator Activity of Calcitonin Gene-Related Peptide in Human Skin. *J. Investig. Derm.* **1986**, *87*, 533–536. [CrossRef]
27. Bunker, C.B.; Reavley, C.; Dowd, P.M.; O'Shaughnessy, D.J. Calcitonin Gene-Related Peptide in Treatment of Severe Peripheral Vascular Insufficiency in Raynaud's Phenomenon. *Lancet* **1993**, *342*, 80–83. [CrossRef]
28. Mitsikostas, D.D.; Reuter, U. Calcitonin Gene-Related Peptide Monoclonal Antibodies for Migraine Prevention: Comparisons across Randomized Controlled Studies. *Curr. Opin. Neurol.* **2017**, *30*, 272–280. [CrossRef]
29. Garry, M.G.; Hargreaves, K.M. Enhanced Release of Immunoreactive CGRP and Substance P from Spinal Dorsal Horn Slices Occurs during Carrageenan Inflammation. *Brain Res.* **1992**, *582*, 139–142. [CrossRef]
30. Kawasaki, H.; Takasaki, K.; Saito, A.; Goto, K. Calcitonin Gene-Related Peptide Acts as a Novel Vasodilator Neurotransmitter in Mesenteric Resistance Vessels of the Rat. *Nature* **1988**, *335*, 164–167. [CrossRef] [PubMed]
31. Cao, T.; Pintér, E.; Al-Rashed, S.; Gerard, N.; Hoult, J.R.; Brain, S.D. Neurokinin-1 Receptor Agonists Are Involved in Mediating Neutrophil Accumulation in the Inflamed, but Not Normal, Cutaneous Microvasculature: An in Vivo Study Using Neurokinin-1 Receptor Knockout Mice. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5424–5429. [CrossRef] [PubMed]
32. Biella, G.; Panara, C.; Pecile, A.; Sotgiu, M.L. Facilitatory Role of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) on Excitation Induced by Substance P (SP) and Noxious Stimuli in Rat Spinal Dorsal Horn Neurons. An Iontophoretic Study in Vivo. *Brain Res.* **1991**, *559*, 352–356. [CrossRef]
33. Le Grevés, P.; Nyberg, F.; Hökfelt, T.; Terenius, L. Calcitonin Gene-Related Peptide Is Metabolized by an Endopeptidase Hydrolyzing Substance P. *Regul. Pept.* **1989**, *25*, 277–286. [CrossRef] [PubMed]
34. Le Greves, P.; Nyberg, F.; Terenius, L.; Hökfelt, T. Calcitonin Gene-Related Peptide Is a Potent Inhibitor of Substance P Degradation. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *115*, 309–311. [CrossRef] [PubMed]
35. Oku, R.; Satoh, M.; Fujii, N.; Otaka, A.; Yajima, H.; Takagi, H. Calcitonin Gene-Related Peptide Promotes Mechanical Nociception by Potentiating Release of Substance P from the Spinal Dorsal Horn in Rats. *Brain Res.* **1987**, *403*, 350–354. [CrossRef] [PubMed]
36. Kangrga, I.; Larew, J.S.A.; Randic, M. The Effects of Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide on the Efflux of Endogenous Glutamate and Aspartate from the Rat Spinal Dorsal Horn in Vitro. *Neurosci. Lett.* **1990**, *108*, 155–160. [CrossRef]
37. Cooper, D.; Laidig, W.D.; Sappington, A.; MacGregor, G. A Pharmacological Review of Calcitonin Gene-Related Peptide Biologics and Future Use for Chronic Pain. *Cureus* **2023**, *15*, e35109. [CrossRef]
38. Nicoll, R.A.; Schenker, C.; Leeman, S.E. Substance P as a Transmitter Candidate. *Annu. Rev. Neurosci.* **1980**, *3*, 227–268. [CrossRef]
39. Lawson, S.N.; Crepps, B.A.; Perl, E.R. Relationship of Substance P to Afferent Characteristics of Dorsal Root Ganglion Neurones in Guinea-Pig. *J. Physiol.* **1997**, *505*, 177–191. [CrossRef]
40. Janikiewicz, P.; Wasilewska, B.; Mazur, U.; Franke-Radowiecka, A.; Majewski, M.; Bossowska, A. The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13399. [CrossRef]
41. Han, D.S.; Lee, C.H.; Shieh, Y.D.; Chang, C.T.; Li, M.H.; Chu, Y.C.; Wang, J.L.; Chang, K.V.; Lin, S.H.; Chen, C.C. A Role for Substance P and Acid-Sensing Ion Channel 1a in Prolotherapy with Dextrose-Mediated Analgesia in a Mouse Model of Chronic Muscle Pain. *Pain* **2022**, *163*, E622–E633. [CrossRef]
42. Kozłowska, A.; Mikołajczyk, A.; Adamiak, Z.; Majewski, M. Distribution and Chemical Coding of Sensory Neurons Innervating the Skin of the Porcine Hindlimb. *Neuropeptides* **2017**, *61*, 1–14. [CrossRef]
43. McCarthy, P.W.; Lawson, S.N. Cell Type and Conduction Velocity of Rat Primary Sensory Neurons with Substance P-like Immunoreactivity. *Neuroscience* **1989**, *28*, 745–753. [CrossRef] [PubMed]
44. Simões, A.L.B.; Silva, G.A.R.; Giorgetto, C.; de Cassia do Carmo-Campos, E.; Dias, F.J.; Fazan, V.P.S. Substance P in Dorsal Root Ganglion Neurons in Young and Adult Rats, after Nociceptive Stimulation during the Neonatal Period. *Anat. Rec.* **2018**, *301*, 849–861. [CrossRef] [PubMed]
45. Kourosh-Arami, M.; Hosseini, N.; Mohsenzadegan, M.; Komaki, A.; Joghataei, M.T. Neurophysiologic Implications of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Rev. Neurosci.* **2020**, *31*, 617–636. [CrossRef]
46. Zhou, L.; Zhu, D.Y. Neuronal Nitric Oxide Synthase: Structure, Subcellular Localization, Regulation, and Clinical Implications. *Nitric Oxide* **2009**, *20*, 223–230. [CrossRef] [PubMed]
47. Thippeswamy, T.; Morris, R. The Roles of Nitric Oxide in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *962*, 103–110. [CrossRef] [PubMed]
48. Zheng, Q.; Dong, X.; Green, D.P.; Dong, X. Peripheral Mechanisms of Chronic Pain. *Med. Rev.* **2022**, *2*, 251–270. [CrossRef]

49. Rocha, P.A.; Ferreira, A.F.B.; Da Silva, J.T.; Alves, A.S.; Martins, D.O.; Britto, L.R.G.; Chacur, M. Effects of Selective Inhibition of NNOS and INOS on Neuropathic Pain in Rats. *Mol. Cell. Neurosci.* **2020**, *105*, 103497. [CrossRef]
50. Solanki, K.; Rajpoot, S.; Bezsonov, E.E.; Orekhov, A.N.; Saluja, R.; Wary, A.; Axen, C.; Wary, K.; Baig, M.S. The Expanding Roles of Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS1). *PeerJ* **2022**, *10*, e13651. [CrossRef]
51. Terenghi, G.; Riveros-Moreno, V.; Hudson, L.D.; Ibrahim, N.B.N.; Polak, J.M. Immunohistochemistry of Nitric Oxide Synthase Demonstrates Immunoreactive Neurons in Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia of Man and Rat. *J. Neurol. Sci.* **1993**, *118*, 34–37. [CrossRef]
52. Tan, L.L.; Bornstein, J.C.; Anderson, C.R. Distinct Chemical Classes of Medium-Sized Transient Receptor Potential Channel Vanilloid 1-Immunoreactive Dorsal Root Ganglion Neurons Innervate the Adult Mouse Jejunum and Colon. *Neuroscience* **2008**, *156*, 334–343. [CrossRef] [PubMed]
53. Russo, D.; Clavenzani, P.; Mazzoni, M.; Chiocchetti, R.; Di Guardo, G.; Lalatta-Costerbosa, G. Immunohistochemical Characterization of TH13-L2 Spinal Ganglia Neurons in Sheep (*Ovis aries*). *Microsc. Res. Tech.* **2010**, *73*, 128–139. [CrossRef] [PubMed]
54. Wiesenfeld-Hallin, Z.; Xu, X.J. Galanin in Somatosensory Function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *863*, 383–389. [CrossRef] [PubMed]
55. Hökfelt, T.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Villar, M.; Melander, T. Increase of Galanin-like Immunoreactivity in Rat Dorsal Root Ganglion Cells after Peripheral Axotomy. *Neurosci. Lett.* **1987**, *83*, 217–220. [CrossRef]
56. Hao, J.-X.; Shi, T.-J.; Xu, I.S.; Kaupilla, T.; Xu, X.-J.; Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Wiesenfeld-Hallin, Z. Intrathecal Galanin Alleviates Allodynia-like Behaviour in Rats after Partial Peripheral Nerve Injury. *Eur. J. Neurosci.* **1999**, *11*, 427–432. [CrossRef]
57. Metcalf, C.S.; Klein, B.D.; McDougle, D.R.; Zhang, L.; Smith, M.D.; Bulaj, G.; White, H.S. Analgesic Properties of a Peripherally Acting and GalR2 Receptor-Preferring Galanin Analog in Inflammatory, Neuropathic, and Acute Pain Models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *352*, 185–193. [CrossRef]
58. Lang, R.; Gundlach, A.L.; Holmes, F.E.; Hobson, S.A.; Wynick, D.; Hökfelt, T.; Kofler, B. Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 118–175. [CrossRef]
59. Moller, K.; Zhang, Y.Z.; Håkanson, R.; Luts, A.; Sjölund, B.; Uddman, R.; Sundler, F. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide Is a Sensory Neuropeptide: Immunocytochemical and Immunochemical Evidence. *Neuroscience* **1993**, *57*, 725–732. [CrossRef]
60. Zhang, Q.; Shi, T.J.; Ji, R.R.; Zhang, Y.; Sundler, F.; Hannibal, J.; Fahrenkrug, J.; Hökfelt, T. Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Dorsal Root Ganglia Following Axotomy: Time Course and Coexistence. *Brain Res.* **1995**, *705*, 149–158. [CrossRef]
61. Mulder, H.; Uddman, R.; Moller, K.; Zhang, Y.Z.; Ekblad, E.; Alumets, J.; Sundler, F. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Expression in Sensory Neurons. *Neuroscience* **1994**, *63*, 307–312. [CrossRef]
62. Corness, J.; Shi, T.J.; Xu, Z.Q.; Brulet, P.; Hökfelt, T. Influence of Leukemia Inhibitory Factor on Galanin/GMAP and Neuropeptide Y Expression in Mouse Primary Sensory Neurons after Axotomy. *Exp. Brain Res.* **1996**, *112*, 79–88. [CrossRef] [PubMed]
63. Lioudyno, M.; Skoglösa, Y.; Takei, N.; Lindholm, D. Rapid Communication Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Protects Dorsal Root Ganglion Neurons From Death and Induces Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Immunoreactivity In Vitro. *J. Neurosci. Res.* **1998**, *51*, 243–256. [CrossRef]
64. Xu, X.; Yang, X.; Zhang, P.; Chen, X.; Liu, H.; Li, Z. Effects of Exogenous Galanin on Neuropathic Pain State and Change of Galanin and Its Receptors in DRG and SDH after Sciatic Nerve-Pinch Injury in Rat. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37621. [CrossRef]
65. Zacharko-Siembida, A.; Kulik, P.; Szalak, R.; Lalak, R.; Arciszewski, M.B. Co-Expression Patterns of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) with Neuropeptides in Dorsal Root Ganglia of the Pig. *Acta Histochem.* **2014**, *116*, 390–398. [CrossRef]
66. Kozsurek, M.; Lukácsi, E.; Fekete, C.; Wittmann, G.; Réthelyi, M.; Puskár, Z. Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Peptide (CART) Is Present in Peptidergic C Primary Afferents and Axons of Excitatory Interneurons with a Possible Role in Nociception in the Superficial Laminae of the Rat Spinal Cord. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *26*, 1624–1631. [CrossRef]
67. Hökfelt, T.; Elde, R.; Johansson, O.; Luft, R.; Nilsson, G.; Arimura, A. Immunohistochemical Evidence for Separate Populations of Somatostatin-Containing and Substance P-Containing Primary Afferent Neurons in the Rat. *Neuroscience* **1976**, *1*, 131–136, IN19–IN24. [CrossRef] [PubMed]
68. Kardon, A.P.; Polgár, E.; Hachisuka, J.; Snyder, L.M.; Cameron, D.; Savage, S.; Cai, X.; Karnup, S.; Fan, C.R.; Hemenway, G.M.; et al. Dynorphin Acts as a Neuromodulator to Inhibit Itch in the Dorsal Horn of the Spinal Cord. *Neuron* **2014**, *82*, 573–586. [CrossRef]
69. Stantcheva, K.K.; Iovino, L.; Dhandapani, R.; Martinez, C.; Castaldi, L.; Nocchi, L.; Perlas, E.; Portulano, C.; Pesaresi, M.; Shirlekar, K.S.; et al. A Subpopulation of Itch-Sensing Neurons Marked by Ret and Somatostatin Expression. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 585–600. [CrossRef]
70. Friedrich, T.; Stengel, A. Current State of Phoenixin-the Implications of the Pleiotropic Peptide in Stress and Its Potential as a Therapeutic Target. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1076800. [CrossRef]
71. Antal, M.; Polgár, E.; Chalmers, J.; Minson, J.B.; Llewellyn-Smith, I.; Heizmann, C.W.; Somogyi, P. Different Populations of Parvalbumin- and Calbindin-D28k-Immunoreactive Neurons Contain GABA and Accumulate 3H-D-Aspartate in the Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord. *J. Comp. Neurol.* **1991**, *314*, 114–124. [CrossRef] [PubMed]

72. Egea, J.; Malmierca, E.; Rosa, A.O.; Del Barrio, L.; Negredo, P.; Nuñez, A.; López, M.G. Participation of Calbindin-D28K in Nociception: Results from Calbindin-D28K Knockout Mice. *Pflug. Arch.* **2012**, *463*, 449–458. [CrossRef]
73. Ren, K.; Ruda, M.A.; Jacobowitz, D.M. Immunohistochemical Localization of Calretinin in the Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord of the Rat. *Brain Res. Bull.* **1993**, *31*, 13–22. [CrossRef] [PubMed]
74. Stebbing, M.J.; Balasubramanyan, S.; Smith, P.A. Calbindin-D-28K like Immunoreactivity in Superficial Dorsal Horn Neurons and Effects of Sciatic Chronic Constriction Injury. *Neuroscience* **2016**, *324*, 330–343. [CrossRef] [PubMed]
75. Ichikawa, H.; Jacobowitz, D.M.; Sugimoto, T. Calretinin-Immunoreactive Neurons in the Trigeminal and Dorsal Root Ganglia of the Rat. *Brain Res.* **1993**, *617*, 96–102. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

cells

MDPI

Article

Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix

Urszula Mazur, Paulina Kuśmierek, Paweł Janikiewicz, Mariusz Krzysztof Majewski * and Agnieszka Bossowska

Department of Human Physiology and Pathophysiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Warszawska 30, 10-082 Olsztyn, Poland; urszula.mazur@uwm.edu.pl (U.M.); paulina.kusmierek@uwm.edu.pl (P.K.); pawel.janikiewicz@uwm.edu.pl (P.J.); agnieszka.bossowska@uwm.edu.pl (A.B.)

* Correspondence: mariusz.majewski@uwm.edu.pl; Tel.: +48-89-524-56-42

Abstract

One of most important parts of the female genital tract is the uterine cervix, both from the anatomical as well as physiological points of view. As there is currently a lack of detailed information on the presence, distribution pattern(s), and the chemical coding of phoenixin (PNX)-containing dorsal root ganglia (DRG) neurons supplying the porcine uterine cervix, this study, using combined retrograde tracing and double-immunofluorescence techniques, was aimed at analyzing (i) the distribution pattern of uterine cervix-supplying sensory neurons (UC-SNs) at the particular spinal cord levels, (ii) their intraganglionic distribution, and (iii) the patterns of PNX co-expression with other biologically active substances. UC-SNs were identified by the presence of deposits of Fast Blue (FB), in DRG of thoracic (Th10–Th15), lumbar (L1–L5) and sacral (S2–S4) spinal cord segments. FB^+/PNX^+ neurons constitute approximately 33% of all UC-SNs, 73% at the L, and 27% at the S neuromeres. These neurons were mainly small sized (52%), with a slightly smaller population of medium-sized cells (40%), while large-diameter cells made up the least numerous population (8%). The vast majority of FB^+/PNX^+ neurons simultaneously contained calcitonin gene-related peptide (CGRP; 80.9%) or substance P (SP; 77.9%); one-third of them showed immunoreactivity toward neuronal nitric oxide synthase (nNOS; 34%), while PNX^+ UC-SNs containing pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), galanin (GAL), calretinin (CRT), or somatostatin (SOM) formed significantly smaller populations (21.4%, 7.4%, 3.1%, and 0.7%, respectively). The results of the present study demonstrate the presence of PNX in DRG UC-SNs, and its co-occurrence with numerous neurotransmitters suggesting a putative role for this neuropeptide in the transmission of various types of sensory information and possible effects on the functioning of this organ in the body.

Keywords: phoenixin-14; pig; dorsal root ganglia; uterine cervix; neuropeptides; immunofluorescence

check for updates

Academic Editor: Arpad Dobolyi

Received: 13 October 2025
Revised: 1 November 2025
Accepted: 20 November 2025
Published: 23 November 2025

Citation: Mazur, U.; Kuśmierek, P.; Janikiewicz, P.; Majewski, M.K.; Bossowska, A. Distribution and Neurochemical Characterization of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Containing Phoenixin (PNX) and Supplying the Porcine Uterine Cervix. *Cells* **2025**, *14*, 1847. https://doi.org/10.3390/cells14231847

Copyright: © 2025 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/).

1. Introduction

Phoenixin-14 (PNX) is a bioactive peptide discovered in the rat brain [1]. It is highly conserved across mammalian and non-mammalian species with PNX-14 and -20 being the most prominent bioactive forms giving rise to its physiological importance [2]. PNX-14 is identical among multiple species including human, rat, mouse, pig, and dog whereas

PNX-20 differs in one amino acid between the coding region of human, canine, or porcine sequences. Despite these differences in sequence length, they appear to function similarly [2]. Both are evolutionarily conserved products of post-translational processing of the prohormone SMIM20 with the difference that PNX-20 is expressed mainly in the hypothalamus, whereas PNX-14 is more abundant in the heart and the spinal cord [3,4].

Simultaneously with the discovery of PNX in 2013, Lyu and Yosten proposed two "main" functions for PNX: the participation in sensory transmission, as well as the control of reproductive processes [1,2]. Recent literature reports indicate that PNX plays a significant role in the activity of the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis: it has a direct effect on the secretion patterns of pituitary gonadotropins [5], most probably by raising the production of gonadoliberin (GnRH) receptor mRNA, controlling in this way the release of luteinizing hormone (LH) [2]. Furthermore, the presence of PNX in neurons of magnocellular paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus suggests the secretion of this peptide into the systemic circulation and therefore its possible transport to sites of action in the periphery [5]. To date, research has been conducted on the possible functions of PNX in the ovary [3], including isolated ovarian follicles [6] and the uterine endometrium. In vitro studies on human ovarian follicles have shown that PNX, through activation of the G-protein-coupled receptor 173 (GPR173), enhances the activity of genes related to the ovarian follicle development, promoting their growth by accelerating the proliferation of granulosa cells, which leads to an increased number of ovulated oocytes [6,7]. GPR173 levels increased in ovarian follicles as estrus progressed [7]. Later studies have shown that PNX and its receptor are produced locally in the porcine corpus luteum and participate in the regulation of the follicular phase [6] and luteal phase, and their levels change during the estrous cycle [8]. There is evidence that the effect of PNX on the secretion of reproductive hormones is due to its interaction with other peptides involved in reproduction, such as nesfatin-1, which can potentiate the effect of PNX on the release of reproductive hormones such as LH, follicle-stimulating hormone (FSH), and testosterone in male rats [9]. Elevated levels of PNX have been observed in the blood of women suffering from the polycystic ovary syndrome (PCOS) [10], in both lean and obese patients [11] and in girls with precocious puberty, indicating its possible role in puberty [12]. In turn, reduced PNX levels were observed in serum in patients with endometriosis, which may suggest its involvement in the pathogenesis of the disease, as well as in the exacerbation of pelvic pain associated with cyclical changes in the endometrium [13]. Further studies have shown that endometrial cells increase the synthesis of the SMIM20 precursor in response to low PNX levels, which may suggest a potential role of PNX in improving epithelial dysfunction [14] and may be an effective strategy for using PNX in the treatment of endometriosis.

PNX was also detected in sites traditionally not directly associated with reproduction. The first studies in rodents shed light on the sensory nature of this peptide, through its presence in the superficial layers of the dorsal horn (DH) of the spinal cord, in a fairly numerous subpopulation of dorsal root ganglia (DRG) neurons and in the trigeminal and nodose ganglion cells [1]. In the domestic pig the presence of PNX has been reported in nerve fibers forming a dense plexus in laminae I and II of the DH [15]. This topographic distribution of PNX^+ terminals indicates that these nerve fibers originated mainly from DRG neurons [16].

Although increasing evidence suggests that PNX participates in the controlling of numerous gonadal and endometrial functions, data are still lacking regarding both the presence and origin of PNX^+ nerve fibers in the cervix. Because our pilot study (unpublished data) observed numerous PNX^+ fibers in the cervical wall, the location of which could suggest their afferent nature, in this study we decided to investigate both the sources of PNX^+ innervation and the chemical coding of sensory cells supplying the uterine cervix

using a combination of retrograde neuronal labeling techniques and the double immunofluorescence staining. Furthermore, in a previous experiment [16], the chemical coding of PNX^+ neurons at all levels of the spinal cord was initially characterized, providing a solid basis for analyzing both the distribution and the neurochemical characteristics of DRG cells supplying the uterine cervix. It was decided to conduct this research on domestic pigs because they share many embryonic, anatomical, and physiological similarities with humans and therefore appear to be a suitable animal model for biomedical research, including those focusing on the reproductive tract [17].

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals

The research was carried out on sexually immature female pigs of the Large White Polish race (n = 6; age: 8–12 weeks; body weight (b.w.): 15–20 kg). All animals from the industrial fattening farm, after being delivered to the animal house of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, were kept in a standard regime for this type of laboratory animals, with unlimited access to drinking water and appropriately portioned, standard feed mixture appropriate for their age (Grower Plus, Wipasz, Wadag, Poland). The animals were housed and treated in accordance with the rules of the both during the animal housing (pre- and postoperative periods) and during planned surgical procedures; the guidelines contained in the decision (No. 40/2020 from 22 July 2020) of the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Olsztyn (affiliated with the National Ethics Commission for Animal Experimentation, Polish Ministry of Science and Higher Education) were strictly followed to both minimize the number of animals used in this experiment and minimize their suffering.

2.2. Anesthesia and Surgical Procedures

Each planned surgical procedure was preceded by the induction of full anesthesia. For this purpose, each animal received, 30 min before the administration of the main anesthetic (Thiopental; (sodium pentobarbital), Sandoz, Warsaw, Poland; 0.5 g per animal, administered intravenously), subcutaneous injections of atropine (Polfa, Warsaw, Poland, 0.05 mg/kg b.w.) and intramuscular injections of azaperone (Stresnil, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium, 2.5 mg/kg b.w.). The corneal test was used each time as a measure of the depth of anesthesia achieved in each individual animal. The uterine cervix was carefully exposed after a midline laparotomy, and a total volume of 40 µL of 5% aqueous solution of the fluorescent retrograde tracer Fast Blue (FB) (Dr. K. Illing KG & Co GmbH, Gross Umstadt, Germany) was injected into its wall. The tracer was administered in multiple injections (1 µL of the dye solution per injection using a Hamilton microsyringe equipped with a 26S gauge needle) under the serosa along its entire length, maintaining a similar distance between the injection sites. Possible leakage of FB from the injection channel and, consequently, contamination of the surrounding tissues, which would have been the reason for excluding the animal from the study group, was prevented by keeping the needle in the injection channel for at least one minute without moving it. The surface of the injected cervix was then gently wiped with gauze moistened with physiological saline after each injection. Three weeks later, which is an optimal time for the retrograde tracer to be transported to the DRG from the cervix, all the pigs were deeply anesthetized (following the same procedure as described above) and after the cessation of breathing, transcardially perfused with freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Afterwards, the spinal cords with DRG were collected from all the animals. As previously described in detail [16], individual spinal cord levels with corresponding

DRGs were postfixed, thoroughly washed in 0.1 M phosphate buffer, and finally transferred to and stored in 18% buffered sucrose at 4 °C until sectioning.

2.3. Sectioning the Tissue Samples

Based on the previously presented detailed protocol for handling the examined tissues [16], bilateral DRG from thoracic (Th: Th10–Th15), lumbar (L: L1–L6), and sacral (S: S1–S4) spinal cord levels were pairwise located on a frozen block of the optimal cutting temperature (OCT) compound in a manner allowing easy determination of the position of individual subdomains of DRG sections under the microscope. Frozen DRG pairs were cut with an HM525 Zeiss freezing microtome on transverse 10 μm-thick serial sections (four sections on each slide) and mounted on chrome alum-gelatine-coated slides.

2.4. Estimation of the Total Number of FB^+ DRG Uterine Cervix-Supplying Neurons (UC-SNs)

To calculate the relative number of UC-SNs FB^+ nerve cells the previously used protocol [18] was applied. Briefly, retrogradely labeled UC-SNs were counted in every fourth section (to avoid double-counting of the same neuron) of both the right and the left DRG of all the animals. It should be stressed that only neurons with a clearly visible nucleus were counted. The results were pooled for every experimental animal and statistically analyzed, and the mean number of FB-positive cells was calculated. The total number of FB^+ nerve cells counted in all collected DRG from a particular animal as well as the relative frequencies of perikarya in the ganglia belonging to the individual neuronal size classes were presented as mean ± SEM (standard error of mean). The diameter of the FB^+ perikarya was measured by means of an image analysis software (version 3.02, Soft Imaging System, Münster, Germany), and data were used to divide UC-SNs into the three size-classes: small (average diameter up to 40 μm), medium-sized (diameter 41–70 μm), and large afferent cells (diameter > 71 μm), while the statistical analysis was performed with Graph-Pad Prism 8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.5. Immunohistochemical Procedures

Serial 10 μm-thick DRG sections were processed for double-labeling immunofluorescence (following the details of an earlier described protocol [19] using the combinations of primary immunosera raised in different species). After the immersion of tissues in a blocking solution containing 0.1% bovine serum albumin, 1% Triton X 100, 0.01% sodium azide (NaN_3), 0.05% thimerosal, and 10% normal horse serum in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) for 1h at room temperature to reduce non-specific background staining, sections were repeatedly rinsed in PBS, and then incubated overnight at room temperature with antisera against calcitonin gene related peptide (CGRP), calretinin (CRT), galanin (GAL), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), PNX, somatostatin (SOM), and substance P (SP).

Primary antisera were, as described previously [16], visualized by the use of either fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat-, guinea pig-, or mouse-immunoglobulin G (IgG) specific secondary antisera or streptavidin (CY3)-cojugated rabbit-specific antiserum. After rinsing the tissue with PBS, Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA, F4680) was applied to the section and then the tissue was covered with a coverslip. The colocalization of PNX with other biologically active substances in FB^+ neurons was examined on the consecutive sections obtained from all DRGs studied. Immunostained FB^+ DRG perikarya were evaluated under an Olympus BX61 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with epifluorescence filter for FB and an appropriate filter set for CY3 or FITC. Finally, the obtained data were pooled in all the animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals, and statistically analyzed by Student's two-tailed *t*-test for unpaired data. The results were

statistically analyzed using Graph-Pad Prism 8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The differences were considered to be significant at $p < 0.05$. List of primary antisera and secondary reagents used in the study—see Supplementary Table S1.

2.6. Control of Specificity of Immunohistochemical Procedures

In order to confirm both the lack of tissue contamination with tracer and the specificity of the antibodies used, two previously used protocols [20] were applied in this experiment: (i) Thorough macroscopic examinations of the sites of FB injections and the tissues adjacent to the cervix were performed before collecting the ganglia. The sites of the injections were easily identified by the yellowish-labeled deposition left by the tracer within the uterine cervix wall. Moreover, the injection sites were also observed in the UV lamp rays in the dark room. The tissues adjacent to the cervix were not found to be contaminated with the tracer. All these procedures excluded any leakage of the tracer and validated the specificity of the tracing protocol. (ii) Standard controls, i.e., preabsorption for the neuropeptide antisera (20 µg of appropriate antigen per 1 mL of the corresponding antibody at working dilution; all antigens purchased from Peninsula, R&D Systems, SWANT, Sigma, or Phoenix), as well as omission and replacement of the respective primary antiserum with the corresponding non-immune serum completely abolished immunofluorescence and eliminated specific immunolabelling. List of antigens used in pre-absorption tests—see Supplementary Table S2.

3. Results

3.1. The Distribution Pattern and Morphometrical Characteristics of Porcine UC-SNs

3.1.1. Distribution Pattern of FB^+ Neurons

After the administration of FB into the uterine cervix wall, FB^+ neurons were found in both the left and the right DRG of all the pigs studied. The total number of sensory neurons innervating the uterine cervix per animal ranged from 621 to 735 retrogradely labeled perikarya (682.7 ± 33.2; mean ± SEM). The number of FB^+ neurons per animal ranged from 320 to 418 retrogradely labeled neurons (358.7 ± 30.1) in the left DRG and from 289 to 355 FB-positive sensory nerve cells (320 ± 18.8) in the right ones. No statistically significant differences in the number of FB-containing sensory neurons were observed between the left and the right ganglia studied.

FB-positive neurons were observed in DRG collected from all levels of the spinal cord studied. Approximately 64% (64.1 ± 1.5%) of all FB^+ sensory neurons were located in DRG of S level (S2–S4) of spinal cord, less than 36% (35.3 ± 1.4%) of FB^+ nerve cells were observed in the L DRG (L1–L5), while only single retrogradely traced sensory neurons were found in thoracic DRG (Th12–Th15; due to the fact that FB^+ cells observed in the DRGs of this spinal cord level constituted only 0.6 ± 0.6% of the total UC-SNs population, it was decided not to evaluate their chemical coding patterns in the remainder of the experiment). Details concerning the relative frequency of FB^+ sensory neurons innervating the uterine cervix and observed in the left and the right L and S DRG are shown in Figure 1 and Table 1.

As mentioned above, because only a few nerve cells were presented at the Th level, we focused our attention mainly on retrogradely labeled neurons forming two distinct "centers" located bilaterally in the DRG of the L1–L5 ("L–center") as well as S2–S4 ("S–center") levels of the spinal cord. There were statistically significant differences in the occurrence of FB^+ cells between these two major L and S "centers" ($p = 0.0002$) (Figure 1). The UC-SNs were absent in the bilateral L6 and S1 DRG.

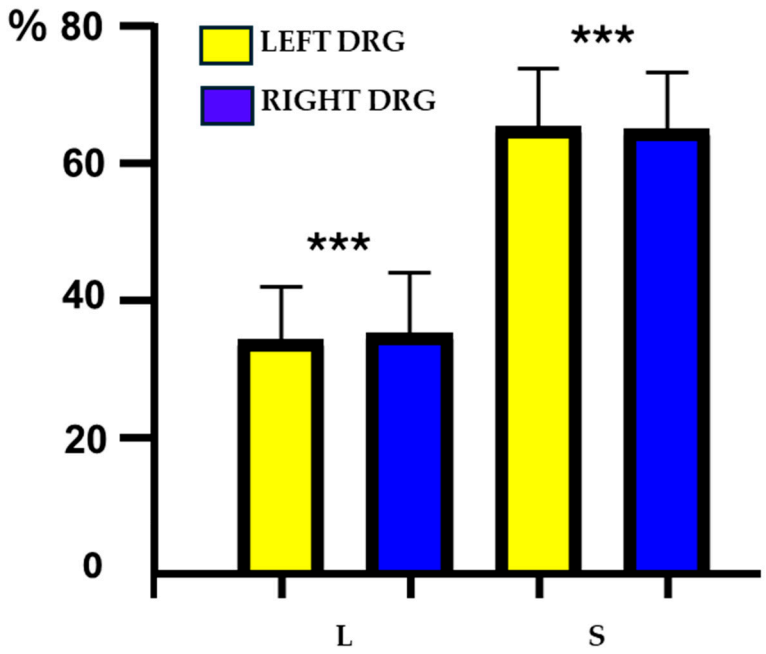


Figure 1. Bar diagram showing the relative percentages of FB-positive (FB^+) sensory neurons located in the dorsal root ganglia (DRG) of the left and the right lumbar (L) and sacral (S) segments of the spinal cord. The data obtained were pooled in all the animals and presented as mean ± standard error of measurement (SEM), referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: *** p = 0.0002.

Table 1. The relative frequency of FB^+ neuronal profiles located in the left and right DRG of Th, L and S levels of the spinal cord. The data obtained were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6).

	Segments of the Spinal Cord %											
DRG	**Th12**	**Th13**	**Th14**	**Th15**	**L1**	**L2**	**L3**	**L4**	**L5**	**S2**	**S3**	**S4**
Left	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.3	1.1 ± 0.6	4.7 ± 0.1	10.3 ± 2.6	14.5 ± 3.4	2.2 ± 0.4	0.4 ± 0.4	37.6 ± 4.4	28.2 ± 7.8
Right	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.4	1.6 ± 1.2	4.5 ± 2.0	12.3 ± 0.8	16.0 ± 1.4	2.8 ± 0.9	0.7 ± 0.6	32.8 ± 5.4	28.9 ± 3.5

3.1.2. Morphometrical Characteristics of FB^+ Sensory Neurons

FB^+ DRG neurons innervating the uterine cervix belonged to the following three cell-sized classes: small (neurons with an average diameter of up to 40 µm), medium (neurons with a diameter ranging from 41 µm to 70 µm), and large (neurons with a diameter of up to 71 µm). In general, almost half of FB^+ sensory neurons belonged to the small perikarya (48.7 ± 0.5%), which slightly predominated over the medium-sized neurons (40.9 ± 1.0%), whereas large cells (10.4 ± 0.7%) formed the smallest population of all DRG FB^+ cells examined. There were no statistically significant differences in the number of FB^+ sensory neurons belonging to these three size classes between the left and the right DRG.

Considering the two main "centers" of FB^+ cells innervating the uterine cervix, in DRG located at the L level of spinal cord, the occurrence of mainly medium-sized cells was observed (45.5 ± 3.3%), while a slightly smaller population was formed by small cells (34.2 ± 5.4%); large-diameter neurons constituted approximately one fifth of the cells counted (20.3 ± 2.4%). In comparison, the results obtained from the DRG of the S level of spinal cord were different: the largest population was composed of small-sized (56.9 ± 3.8%) cells, with almost a half as many medium-sized cells (37.8 ± 3.1%), while the large neurons (5.2 ± 0.8%) were only occasionally found in all the DRGs studied from this level.

On the one hand, no statistically significant differences were observed in the number of small, medium, and large diameter cells in the subpopulations of traced neurons in the left- and the right-sided DRGs studied; on the other hand, such statistically significant differences were observed in the number of small and large diameter cells in the L and S "centers". Details regarding the relative frequency of FB^+ sensory neurons belonging to the different size-classes, as well as the differences observed in their intraganglionic distribution were presented in Table 2. Representative images of FB^+ DRG neurons belonging to the mentioned size classes are presented in Figure 2.

Table 2. Percentages of FB^+ neuronal populations of different size classes (small, medium, large) located in the left and the right DRG of the L and S segments of the spinal cord. The data obtained were pooled in all the animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: ** p = 0.0041; * p = 0.0274.

	Level of the Spinal Cord %					
	L			S		
DRG	Small *	Medium	Large **	Small *	Medium	Large **
Left	37.1 ± 7.6	41.3 ± 4.4	21.6 ± 3.2	59.0 ± 3.8	35.2 ± 3.0	5.8 ± 1.3
Right	34.8 ± 6.9	47.6 ± 3.4	17.6 ± 3.6	55.2 ± 3.5	40.0 ± 3.0	4.8 ± 0.5

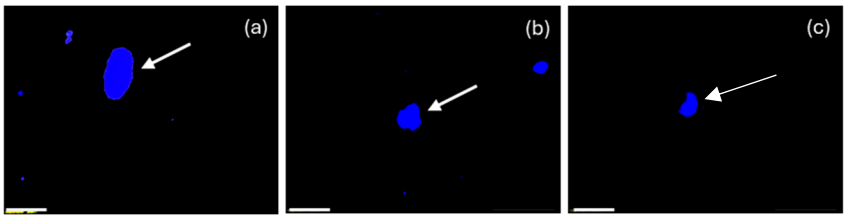


Figure 2. Representative images of the FB^+ nerve cells in the porcine DRG belonging to the different size classes; (**a**) large cell, (**b**) medium-sized cell, (**c**) small-sized cell. The blue profiles visible in (**a**,**b**) which are not indicated by an arrow, are fragments of other traced UC-SNs, cut in a different plane than the one corresponding to their largest diameter. Bar in all the images—50 µm.

3.1.3. Intraganglionic Distribution Patterns of FB^+ Neurons

To determine the intraganglionic distribution patterns of FB^+ sensory neurons in all the DRG examined, an identical "mask" (as used in our previous study [16], shown in (Figure 3), was applied to each of analyzed ganglionic sections.

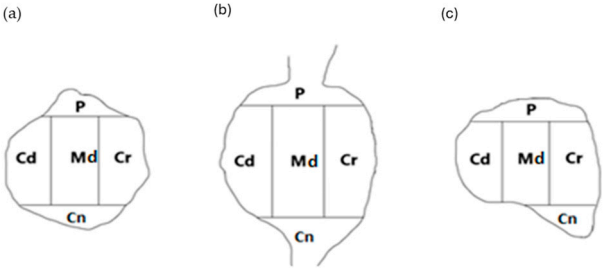


Figure 3. A schematic diagram of DRG section showing its arbitrary division into topographical domains, in which the occurrence and relative frequency of FB^+ sensory neurons were studied: Cn—central domain, Cd—caudal domain, Cr—cranial domain, P—peripheral domain, Md—middle ganglion area; section from the (**a**) proximal, (**b**) middle, and (**c**) distal part of the ganglion.

FB^+ neurons were present in all five ganglion domains: central (Cn), caudal (Cd), cranial (Cr), peripheral (P), and middle (Md). In general, the largest number of FB^+ nerve cells were present in the Cr domain (35.1 ± 2.2%). Slightly fewer neurons were observed in the Cd and P domains (26.0 ± 1.4% and 19.1 ± 0.6%, respectively). The smallest population of FB-positive neurons were those located in the Md (12.1 ± 0.8%) and Cn domains (7.7 ± 0.8%) of all the DRGs studied.

When focusing on the DRG of L level of the spinal cord, a marked accumulation of retrogradely labeled FB^+ nerve cells was found in the Cd domain (35.0 ± 1.1%). Slightly fewer cells were observed in the Cr and P domains (22.6 ± 0.6% and 19.4 ± 1.2%, respectively), while the UC-SNs were the least numerous in the Cn and Md domains (10.7% ± 1.5% and 12.3 ± 1.9%, respectively). In the case of DRG located at the S level of the spinal cord, the largest population of FB^+ sensory neurons was observed in the Cr subdomain (42.2 ± 3.0%), while a slightly smaller number of retrogradely labeled nerve cells has been present in the Cd and P regions (21.2 ± 1.7% and 19.0 ± 0.7%, respectively). Similarly to the L level, the smallest number of UC-SNs was found in the Md (11.6 ± 2.7%) and Cn (6.0 ± 0.4%) regions of DRG of S level of the spinal cord. Details regarding the intraganglionic distribution pattern of retrogradely labeled sensory neurons in the left and the right DRG examined are presented in Table 3.

Table 3. Percentages of the intraganglionic distribution pattern of the population of FB^+ neurons located in the left and the right DRG studied taken from the L and the S levels of the spinal cord. Data obtained from all the animals were combined and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: * p = 0.0471; ** p = 0.0028; ** p = 0.0033.

	Level of the Spinal Cord %									
	L					S				
DRG	**Cn ***	**Cd ****	**Cr ****	**P**	**Md**	**Cn ***	**Cd ****	**Cr ****	**P**	**Md**
Left	13.4 ± 0.4	36.5 ± 1.2	22.4 ± 0.5	15.1 ± 0.3	12.6 ± 1.6	6.6 ± 1.0	22.2 ± 2.8	38.0 ± 4.3	20.0 ± 1.9	13.2 ± 1.2
Right	8.9 ± 1.9	32.9 ± 1.2	22.8 ± 1.8	23.9 ± 1.7	11.5 ± 2.6	5.4 ± 0.4	21.0 ± 2.6	46.2 ± 2.4	17.1 ± 3.0	10.3 ± 1.1

3.2. Distribution Pattern and Morphometrical Characteristics of Porcine FB^+/PNX^+ UC-SNs

The collected data indicate that there are differences in the number of FB^+ nerve cells containing any of the biologically active substances tested between the L and the S "centers" of DRG. Taking into account all the DRGs supplying the uterine cervix, 78.6 ± 2.6% of them contained at least one of the substances tested. However, when analyzing the expression patterns of the compounds tested in the L and the S "centers" separately, neurons expressing at least one of the substances were studied; while as many as 98.2 ± 0.8% of retrogradely labeled L DRG neurons contained at least one of the tested agents, only 65.0 ± 2.6% of traced sensory cells in the S ganglia contained at least one of the tested substances. The type of transmitter(s) used by the "immunonegative" neurons found in this study remains to be elucidated.

3.2.1. Distribution Pattern of FB^+/PNX^+ Neurons

PNX^+ UC-SNs were observed bilaterally in all the DRG examined. The total number of FB^+/PNX^+ sensory neurons *per* animal ranged from 175 to 265 (194 ± 36.3), which represented 33.3 ± 1.7% of all FB-positive sensory nerve cells counted in the DRG examined, of which in the left ganglia, the number of FB^+/PNX^+ neurons *per* animal ranged from 95 to 149 (127.7± 16.5), whereas in the right ganglia it ranged from 80 to 129 cells (108.3 ± 14.6). No statistically significant differences in the number of FB^+/PNX^+ containing sensory nerve cells were observed between the left and the right ganglia. However, when comparing the relative frequencies of PNX^+ neurons in DRG of L vs. S "centers", the vast majority of these cells were present in L DRG (73.4 ± 3.8%), whereas in S ganglia these perikarya were observed in much lower number (26.6 ± 2.5%).

3.2.2. Morphometrical Characteristics of FB^+/PNX^+ DRG Neurons

While generally slightly more than a half of the UC-SNs belonged to the small-diameter class of neurons (52.0 ± 1.1%), 40.5 ± 0.7% of the retrogradely labeled PNX^+ nerve cells were medium sized; large cells constituted less than 10% of the population examined

(7.5 ± 1.9%). However, when the pattern of the L and the S DRG belonging to the three size classes was analyzed separately, some differences between these two anatomical levels were observed.

In the L DRG, the most numerous classes of FB^+/PNX^+ cells were medium-sized neurons (47.0 ± 1.7%); small-diameter perikarya constituted a slightly less numerous group (44.6 ± 44.6 ± 0.6%); large cells were significantly less numerous (8.3 ± 1.8%). In contrast to the pattern observed in the L DRG, in the S DRG, small-diameter PNX^+ cells were most numerous (72.4 ± 2.5%), while medium-sized neurons constituted only 22.2 ± 2.1%. Similarly to the L ganglia, large diameter cells constitute a significant minority in the S DRG (5.3 ± 1.4%).

It should be emphasized that while no statistically significant differences in the distribution of the cells examined were observed between the left- and the right-sided DRG of either the L or the S spinal cord levels, such differences in the number of small- and medium-sized FB^+/PNX^+ cells were found between the L and the S "centers" of the sensory innervation of the uterine cervix. Details concerning the relative frequency of FB^+/PNX^+ sensory neurons of the different size classes in left and the right DRG of both anatomical levels, as well as statistically significant differences observed are shown in Table 4 and Figure 4.

Table 4. Percentages of the population of FB^+/PNX^+ neurons of different sizes (small, medium, large) located in the left and the right DRG of L and S segments of the spinal cord. The data obtained were combined for all animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: *** p = 0.004, *** p = 0.0009.

	Segments of the Spinal Cord (%)					
	L			S		
DRG	Small ***	Medium ***	Large	Small ***	Medium ***	Large
Left	47.4 ± 1.6	42.5 ± 2.9	10.1 ± 2.1	71.9 ± 4.0	22.8 ± 3.7	5.3 ± 2.6
Right	42.1 ± 0.7	50.9 ± 3.2	7.0 ± 1.7	74.5 ± 1.8	21.9 ± 1.8	3.6 ± 2.1

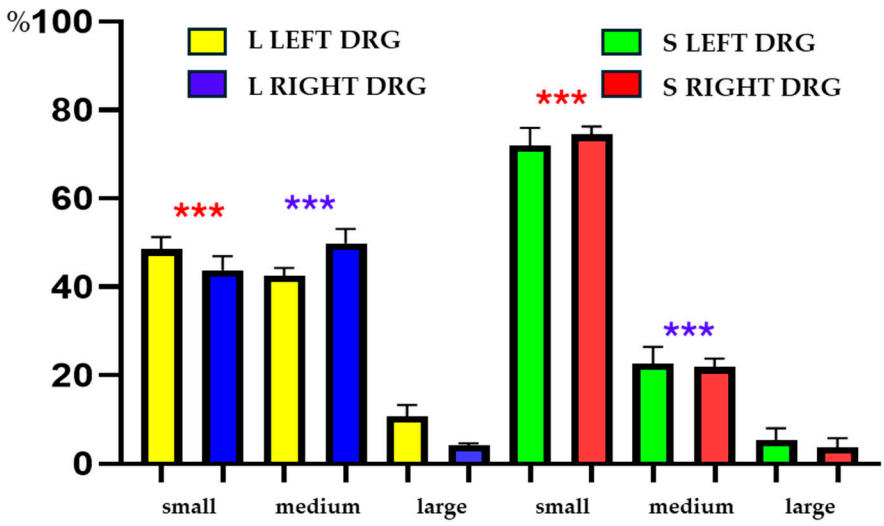


Figure 4. The bar graph showing relative frequencies (%) of subpopulations sizes of PNX^+ and retrogradely labeled neurons located in the individual left and the right DRG of the L and S levels of spinal cord. The data obtained were pooled for each animal and are presented as mean ± SEM. Asterisks mark statistically significant differences: *** p = 0.004, *** p = 0.0009.

3.2.3. Intraganglionic Distribution Patterns of FB^+/PNX^+ Neurons

In general, when summing all FB^+/PNX^+ cells found in the DRG examined, regardless of their location in the L or the S spinal cord levels, a slightly greater accumulation of retrogradely labeled neurons was observed in the Cd region (29.5 ± 1.7%) of the ganglia, while 21.7 ± 0.3% and 20.6 ± 1.3% of them were located in the P and Cr domains, respectively. In the remaining subdomains of the ganglion (Md and Cn), 14.2 ± 2.5% and 14.0 ± 2.8% of all retrogradely

labeled PNX$^+$ cells were found. Also, in terms of the intraganglionic distribution of FB$^+$/PNX$^+$ cells, differences were observed between the DRG of L and S levels: while at both levels of the spinal cord FB$^+$/PNX$^+$ cells constituted similarly numerous subpopulations in the Cd domain (33.2 ± 2.0% vs. 33.4 ± 0.5% of the examined neurons), in the Cr domain they were almost twice as numerous as in the DRG of S levels (17.2 ± 0.8% vs. 33.4 ± 0.5%). While in the P domain the numbers of cells examined were similar in the DRG of both spinal cord levels examined (L: 20.4 ± 3.4% vs. S: 19.2 ± 1.8%), in both the Md domain and the Cn domain FB$^+$/PNX$^+$ perikaryons were slightly more numerous in the L DRG (L: Md: 14.6 ± 1.8% vs. S: 9.5 ± 1.2% and L: Cn: 14.6 ± 1.8% vs. S: 5.5 ± 0.5%, respectively). The details of the intraganglionic distribution pattern of retrogradely labeled PNX$^+$ neurons in the individual domains of the left and the right DRG examined taken from the L and S levels of the spinal cord, as well as statistically significant differences, are presented in Table 5.

Table 5. The intraganglionic distribution pattern of FB$^+$/PNX$^+$ neuronal population, located in the particular subdomains of DRG from the L and S segments of the spinal cord. The data obtained were pooled for each animal (N = 6) and are presented as mean ± SEM. Asterisks mark statistically significant differences: ** p = 0.0030, ** p = 0.0013.

	Segments of the Spinal Cord (%)									
	L					S				
	Cn **	**Cd**	**Cr** **	**P**	**Md**	**Cn** **	**Cd**	**Cr** **	**P**	**Md**
Left	14.5 ± 0.8	33.3 ± 2.0	19.5 ± 3.7	20.7 ± 2.8	12.0 ± 1.5	7.8 ± 1.3	33.3 ± 6.1	29.3 ± 4.9	19.2 ± 1.3	10.4 ± 2.9
Right	14.2 ± 1.7	32.3 ± 3.3	16.0 ± 1.5	20.5 ± 3.8	17.0 ± 2.0	4.4 ± 1.1	35.5 ± 5.7	33.5 ± 4.2	18.0 ± 2.9	8.6 ± 1.0

3.3. Immunohistochemical Characteristic of PNX-Containing UC-SNs in DRG Studied

Analysis of consecutive, double-immunohistochemically labeled serial sections of DRG studied has revealed that the vast majority (97.3 ± 1.4%) of all FB$^+$/PNX$^+$ cells showed simultaneous co-expression of the other substances tested, although the number of cells in the individual subpopulations differed from each other. The remaining FB$^+$/PNX$^+$ perikarya (2.7 ± 1.4%) were immunopositive only for PNX.

3.3.1. Characteristics of FB$^+$ Neurons Co-Localizing PNX and CGRP

The most numerous subset of FB$^+$/PNX$^+$ sensory neurons was composed of cells simultaneously containing CGRP (Figure 5(A1–4)). These cells accounted for 80.9 ± 2.3% of the total population of FB-/PNX-positive neurons and were observed in both the left- and the right-sided DRG (80.0 ± 1.4% and 83.3 ± 4.9%, respectively). While FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons were uniformly distributed in DRG from both sides of the spinal cord, statistically significant differences in the numbers of such coded cells were observed between DRG constituting the L and the S "centers" of the uterine cervix afferent innervation (95.4 ± 2.0% and 42.3 ± 4.1%, respectively; Figure 6, p = 0.0003).

PNX-/CGRP-immunoreactive material was found in FB$^+$ neurons belonging to all three size classes of sensory cells: small- and medium-sized cells were almost equally numerous (46.2 ± 5.7% vs. 47.5 ± 6.0%, respectively), while large-diameter perikarya were distinctly less numerous (6.3 ± 0.3%). Statistically significant differences were observed between the subsets of medium-sized DRG neurons located in the L and the S divisions of the spinal cord (52.2 ± 5.5% vs. 22.6 ± 7.6%, respectively; Table 6).

The majority of FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons were unevenly scattered throughout the individual ganglionic subdomains. The largest population of such cells was found in the Cd domain (34.1 ± 2.5%), while slightly more than 20% of all FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ cells were located in the P and the Cr areas of the ganglia (22.3 ± 2.1%, 20.9 ± 1.6%, respectively); the less numerous populations of FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ perikarya were encountered in the Md and the Cn ganglionic domains (14.9 ± 3.2% and 7.8 ± 1.4%, respectively; Figure 7a).

The distribution pattern of $FB^+/PNX^+/CGRP^+$ neurons in the different domains of L and S DRG studied has been shown in Table 7.

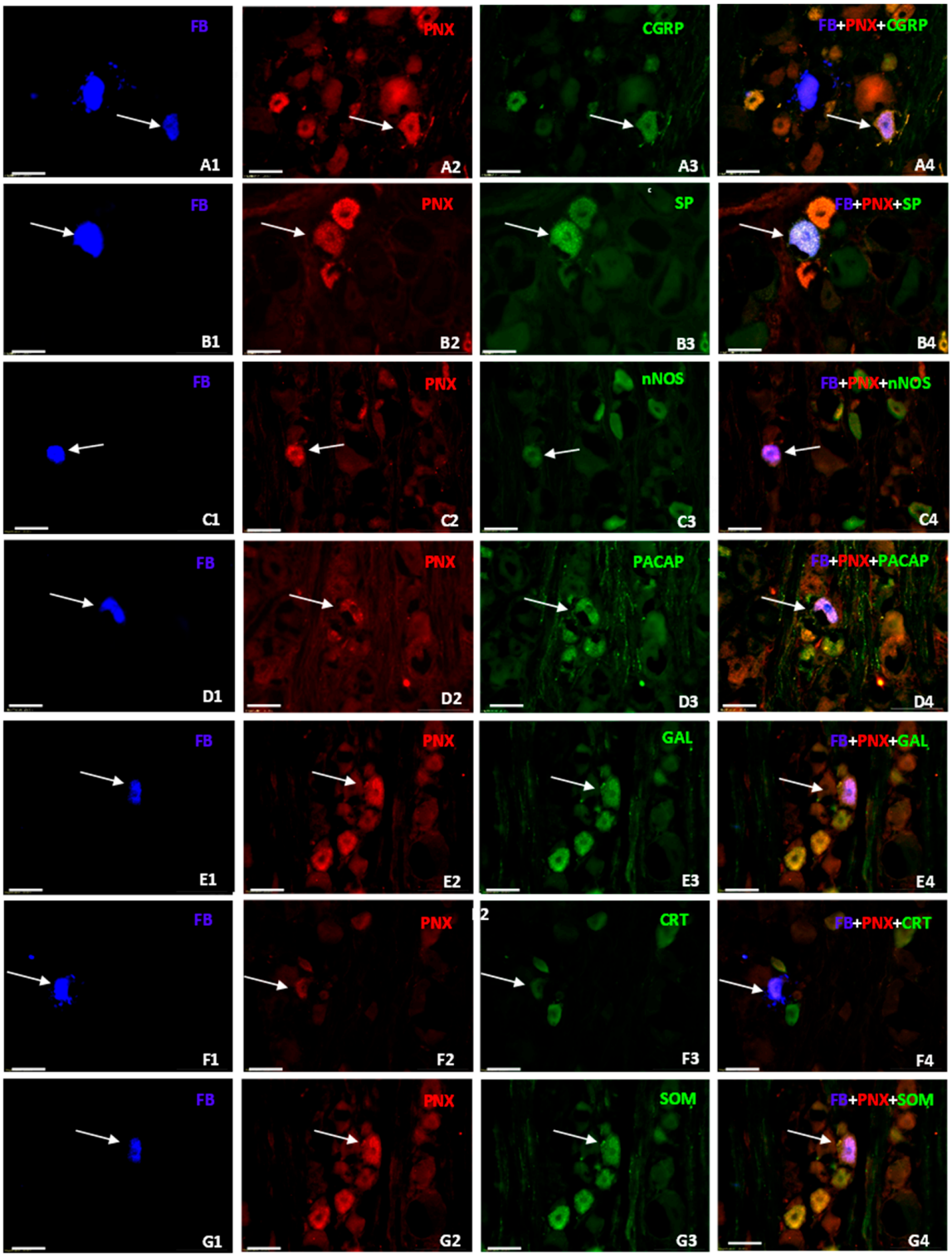


Figure 5. Representative images of DRG neurons supplying the uterine cervix wall in the domestic pig. The images were taken separately from blue (**A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1**, **F1**, **G1**), red (**A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2**, **F2**, **G2**), and green (**A3**, **B3**, **C3**, **D3**, **E3**, **F3**, **G3**) fluorescent channels. Pictures **A4**, **B4**, **C4**, **D4**, **E4**, **F4**, and **G4** represent images where blue, red, and green channels were digitally superimposed. Arrows represent FB+ neurons (**A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1**, **F1**, **G1**) that were simultaneously PNX (**A1**, **A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2**, **F2**, **G2**), CGRP (**A3**), SP (**B3**), nNOS (**C3**), PACAP (**D3**), GAL (**E3**), CRT (**F3**), or SOM (**G3**). Bar in all the images—50 µm.

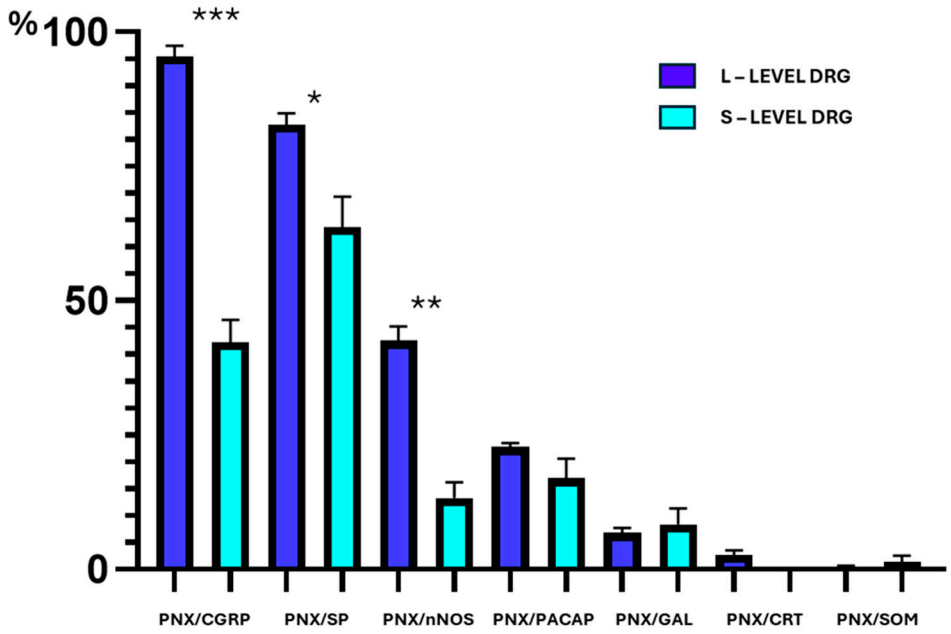


Figure 6. The relative frequency of PNX$^+$ UC-SNs colocalizing the particular neurotransmitters studied in the L (dark blue bars) and the S (light blue bar) segments of DRG. The data obtained were pooled in all the animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6). Asterisks mark statistically significant differences: * $p = 0.0358$; ** $p = 0.0018$; *** $p = 0.0003$.

Table 6. Tabulated summary of the relative frequency (%) of FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ cells in the L and the S DRG examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6). Asterisks mark statistically significant differences: * $p = 0.0376$.

Segment of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small	**Medium** *	**Large**	**Small**	**Medium** *	**Large**
41.6 ± 5.7	52.2 ± 5.5	6.2 ± 0.7	72.2 ± 8.6	22.6 ± 7.6	5.2 ± 2.8

3.3.2. Characteristics of FB$^+$ Neurons Co-Localizing PNX and SP

The second most numerous subpopulation of FB$^+$/PNX$^+$ DRG perikarya was formed by neurons containing simultaneously SP (Figure 5(B1–4)). Such coded cells accounted for 77.9 ± 1.0% of the total population of FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$ UC-SNs found in all the DRG examined. Statistically significant differences in the numbers of FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$ neurons were not observed between the left- and the right-sided DRG studied (75.5 ± 0.7% and 81.2 ± 2.4%, respectively); however, such differences were observed between the L and the S DRG forming the uterine cervix-supplying afferent "centres" (82.7 ± 2.1% and 63.7 ± 5.7%, respectively; Figure 6, $p = 0.0358$). In DRG from both the L and the S levels, the most numerous subgroup of FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$ cells was formed by small-sized neurons (59.3 ± 3.3%), while such coded medium-sized perikarya were distinctly less numerous (36.6 ± 3.4%). In contrast, the retrogradely traced large-diameter neurons co-localizing PNX and SP were sporadically observed, constituting 4.1 ± 0.4%. Details concerning the relative frequency of FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$ sensory neurons observed in the DRG from the L and the S levels of the spinal cord are shown in Table 8.

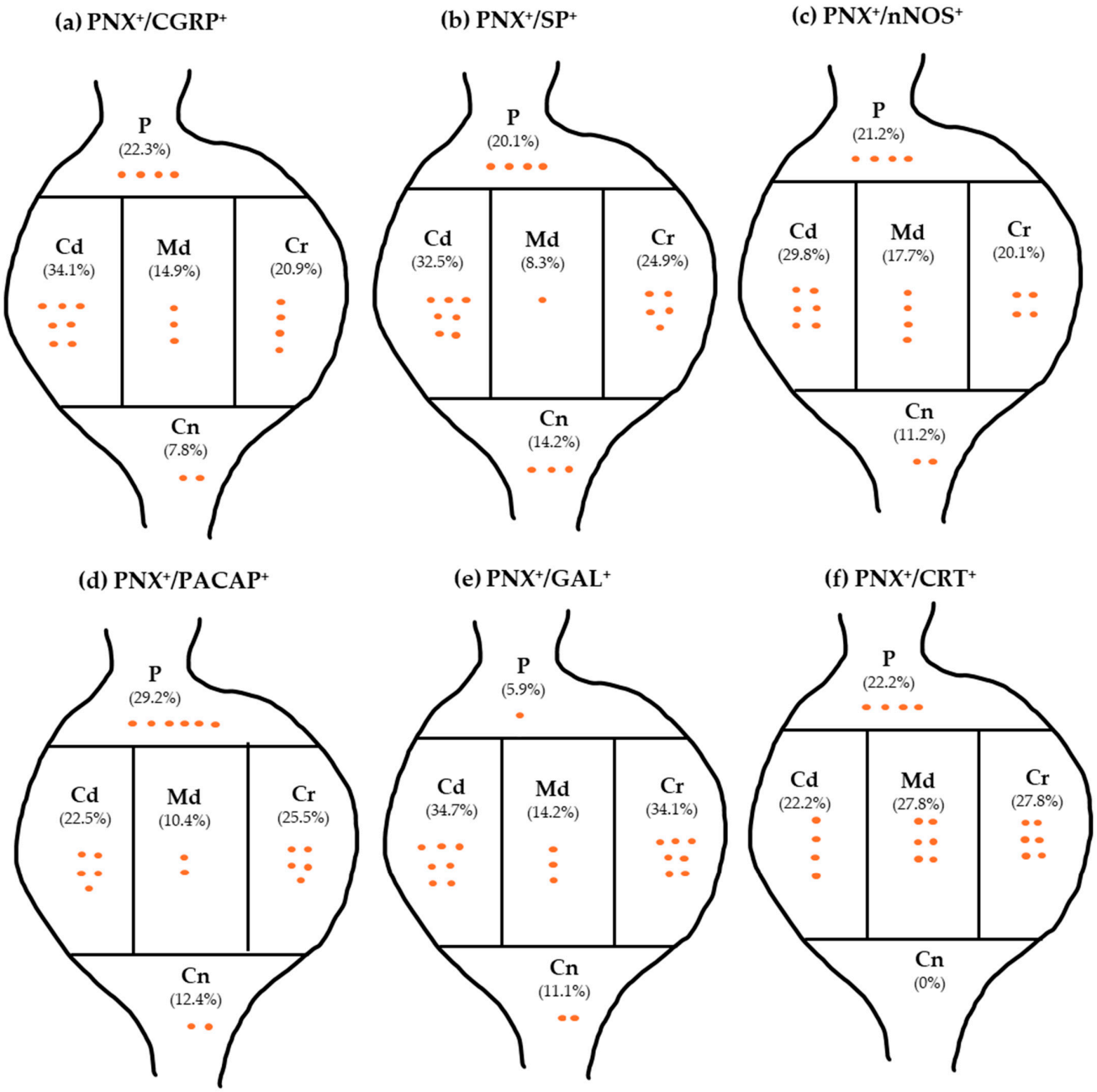


Figure 7. The relative frequency of PNX$^+$ UC-SNs colocalizing particular neurotransmitters in the different ganglionic domains of DRG studied. Each orange dot in the figure represents approximately 5% of the cell population. The data obtained were pooled in all the animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Table 7. The relative frequency (%) of FB$^+$/PNX$^+$/CGRP$^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of L and the S DRG studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Segment of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**	**Cn**	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**
8.7 ± 1.5	33.9 ± 2.9	18.5 ± 0.9	23.0 ± 2.9	15.9 ± 3.3	2.4 ± 2.2	37.7 ± 2.2	37.8 ± 8.0	15.5 ± 4.4	6.6 ± 3.8

A clear marked accumulation of FB$^+$/PNX$^+$/SP$^+$ neurons was found in the Cd ganglion domain (32.5 ± 2.3%), while such encoded UC-SNs were less numerous in the Cr and the P parts of the ganglia (24.9 ± 1.8%, 20.1 ± 1.5%, respectively). A smaller num-

ber of sensory neurons were found in the Cn and the Md part (14.2 ± 2.3%, 8.3 ± 2.0%, respectively) of DRG studied (Figure 7b). It is important to note that in the latter (Cr) domain, a statistically significant difference was observed in the number of $FB^+/PNX^+/SP^+$ neurons between the L and the S DRG forming the uterine cervix-related afferent "centers" (17.8 ± 2.7% vs. 54.4 ± 6.7%, respectively). The details concerning the distribution pattern of $FB^+/PNX^+/SP^+$ UC-SNs in the particular domains of DRG studied have been shown in Table 9.

Table 8. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/SP^+$ cells in the L and the S DRG examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Segment of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small	**Medium**	**Large**	**Small**	**Medium**	**Large**
55.1 ± 5.7	40.5 ± 5.2	4.4 ± 1.7	69.3 ± 8.6	27.7 ± 1.3	3.0 ± 3.0

Table 9. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/SP^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRG studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6). Asterisks mark statistically significant differences: ** $p = 0.0071$.

Segment of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn	**Cd**	**Cr** **	**P**	**Md**	**Cn**	**Cd**	**Cr** **	**P**	**Md**
9.6 ± 1.9	34.7 ± 3.4	17.8 ± 2.7	21.2 ± 1.6	16.7 ± 2.7	2.9 ± 2.9	24.1 ± 2.0	54.4 ± 6.7	13.3 ± 1.3	5.3 ± 3.9

3.3.3. Characteristics of Neurons Co-Localizing PNX and nNOS

The third most abundant subpopulation of FB^+/PNX^+ cells consisted of neurons co-expressing nNOS (34.0 ± 0.9%; Figure 5(C1–4)). While such coded neurons were almost evenly distributed in both the left- and the right-sided DRG studied (35.0 ± 1.8% and 34.6 ± 1.8%), a clear, statistically significant difference was observed in the distribution of these cells between the DRG of the L and the S levels of the spinal cord (42.5 ± 2.6% vs. 13.3 ± 2.9%; Figure 6, $p = 0.0018$).

In DRG at both the L and the S levels, the nitrergic PNX^+ cells supplying the uterine cervix were predominantly small- or medium-diameter cells (56.4 ± 2.6%, 35.7 ± 3.7%, respectively), whereas large-diameter cells constituted only a small proportion (7.6 ± 1.4%). Details concerning the relative frequency of $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ sensory neurons in the DRG examined from the L and the S levels of the spinal cord are shown in Table 10.

Table 10. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ cells in the L and the S DRG examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small	**Medium**	**Large**	**Small**	**Medium**	**Large**
54.3 ± 2.9	37.6 ± 5.0	8.1 ± 2.5	66.7 ± 9.6	27.7 ± 5.5	5.6 ± 5.5

$FB^+/PNX^+/nNOS^+$ sensory neurons were unevenly distributed inside the L and the S DRG, being mainly found in their Cd domain (29.8 ± 3.3%). The remainder of nNOS-containing FB^+/PNX^+ nerve cells were present in the P, Cr, Md, and the Cn (21.2 ± 4.1%, 20.1 ± 1.0%, 17.7 ± 3.6%, 11.2 ± 1.9%, respectively; Figure 7c) domains of DRG studied. However, it should be emphasized that the statistically significant differences in the number

of these neurons were observed in the particular intraganglionic domains (for detail, see Table 11).

Table 11. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/nNOS^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRG studied. Data obtained from all the animals were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals ($N = 6$). Asterisks mark statistically significant differences: ** $p = 0.0052$ * $p = 0.0151$; * $p = 0.0337$; ** $p = 0.0094$.

Segments of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn **	**Cd** *	**Cr** *	**P**	**Md** **	**Cn** **	**Cd** *	**Cr** *	**P**	**Md** **
12.2 ± 2.1	28.2 ± 3.0	18.8 ± 0.6	21.2 ± 4.2	19.6 ± 4.1	0.0 ± 0.0	46.7 ± 3.3	32.7 ± 4.3	20.6 ± 2.4	0.0 ± 0.0

3.3.4. Characteristics of Neurons Co-Localizing PNX and PACAP

In general, the colocalization of PACAP and PNX was found in 21.4 ± 1.3% (Figure 5(D1–D4)) of all retrogradely labeled, uterine cervix-supplying DRG neurons, being almost equally distributed in the left- as well as the right-sided ganglia (21.0 ± 2.3% and 22.4 ± 1.5%, respectively). Furthermore, differences observed in the numbers of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ perikarya located in the L and the S DRG were statistically insignificant (22.8 ± 0.7% vs. 16.9 ± 3.7%, respectively; Figure 6).

When the diameter of sensory neurons was taken into consideration, the colocalization of PACAP and PNX was observed only in two size-classes of FB^+ cells (total number of small- and medium-sized neurons, 61.3 ± 4.6% and 38.7 ± 4.6%, respectively), with large-diameter $PNX^+/PACAP^+$ perikarya being absent. Furthermore, as depicted in Table 12, distinct, statistically significant differences in their distribution pattern were observed between the L and the S DRG.

Table 12. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ cells in the L and the S DRG examined depending on their diameter. The data obtained were pooled in all the animals and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals ($N = 6$). Asterisks mark statistically significant differences: ** $p = 0.0051$, ** $p = 0.0051$.

Segments of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small **	**Medium** **	**Large**	**Small** **	**Medium** **	**Large**
55.8 ± 2.2	44.2 ± 2.2	0.0 ± 0.0	83.6 ± 4.4	16.4 ± 4.4	0.0 ± 0.0

Focusing on the intraganglionic distribution pattern, the majority of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ neurons in the L and S DRG were located in the P, Cr, and the Cd domains (29.2 ± 0.8%, 25.5 ± 1.1%, and 22.5 ± 1.2%, respectively), while the lowest numbers of these cells were observed in the Cn and the Md domains (12.4 ± 1.7% and 10.4 ± 2.9%, respectively; Figure 7d). It should, however, be emphasized that in the L DRG, a markedly lower number of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ cells was found in the P subdomain, when compared with the same region of the S ganglia (26.6 ± 1.7% vs. 53.2 ± 7.0%; $p = 0.0217$). Detailed data concerning the distribution pattern of this subpopulation of the uterine cervix-supplying sensory neurons within different domains of investigated DRG have been summarized in Table 13.

3.3.5. Characteristics of Neurons Co-Localizing PNX and GAL

The UC-SNs, colocalizing PNX and GAL, constituted a fairly small subfraction of all FB^+/PNX^+ DRG neurons (7.4 ± 1.6%; Figure 5(E1–4)), observed in the left and the right DRG (7.5 ± 0.5% and 6.6 ± 2.5%) and composed exclusively of small-diameter cells which were almost equally distributed in both the left and the right sided, as well as in both the L and the S DRGs studied (Figure 6, Table 14).

Table 13. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRG studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: * p = 0.0217; * p = 0.0283; *** p = 0.0009.

Segments of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn ***	Cd	Cr	P *	Md *	Cn ***	Cd	Cr	P *	Md *
13.7 ± 1.5	23.3 ± 1.6	24.6 ± 1.1	26.6 ± 1.7	11.8 ± 3.5	0.0 ± 0.0	9.5 ± 9.5	37.3 ± 6.9	53.2 ± 7.0	0.0 ± 0.0

Table 14. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/GAL^+$ cells in the L and the S DRG examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small	Medium	Large	Small	Medium	Large
100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

In general, $FB^+/PNX^+/GAL^+$ sensory neurons were unevenly distributed between intraganglionic domains, being most numerous in the Cd and the Cr regions (34.7 ± 2.7% and 34.1 ± 3.7% of all traced PNX^+/GAL^+ neurons found, respectively; Figure 7e). The remainder of GAL-containing, FB^+/PNX^+ nerve cells were present in the Md, Cn, and the P (14.2 ± 5.4%, 11.1 ± 6.6% and 5.9 ± 3.0%, respectively) domains of DRG studied. However, while in the L DRG a few labeled neurons were found in all intraganglionic domains, the location of these cells in S DRG were restricted exclusively to the Cd and the Cr regions of the ganglia. Details concerning the distribution pattern of PNX^+/GAL^+ UC-SNs in the particular domains of L and the S DRG have been summarized in Table 15.

Table 15. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/GAL^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRG studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn	Cd	Cr	P	Md	Cn	Cd	Cr	P	Md
3.7 ± 3.7	41.5 ± 5.9	37.4 ± 8.1	3.7 ± 3.7	13.7 ± 8.7	0.0 ± 0.0	33.3 ± 16.6	66.7 ± 16.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

3.3.6. Characteristics of Neurons Co-Localizing PNX and CRT

The co-incidence of PNX and CRT was found in an even smaller population of all DRG sensory neurons supplying the uterine cervix (3.1 ± 1.6%; Figure 5(F1–4)). These neurons were found exclusively in the L DRG, represented by small- (61.3 ± 5.6%) and medium-sized perikarya (38.7 ± 5.6%); (Table 16), and distributed relatively evenly in all subdomains of the ganglia, except for the Cn domain, where they were not observed (Figure 7f, Table 17). It should be pointed out once again that this subset of uterine cervix-supplying perikarya was absent in the S DRG (Figure 6).

Table 16. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/CRT^+$ cells in the L and the S DRGs examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6). Asterisks mark statistically significant differences: ** p = 0.0022; *** p = 0.0004.

Segments of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small ***	Medium **	Large	Small ***	Medium **	Large
61.3 ± 5.6	38.7 ± 5.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

3.3.7. Characteristics of Neurons Co-Localizing PNX and SOM

The smallest subpopulation of FB^+/PNX^+ nerve cells found in this study (in the bilateral DRG, left-sided vs. right-sided, 0.3 ± 0.3% vs. 0.7 ± 0.3%, respectively) was the one whose neurons simultaneously contained SOM (0.7 ± 0.1% of all FB^+/PNX^+ neurons; Figure 5(G1–4)), and exclusively found in the small- and medium-sized perikarya (see Table 18, Figure 6).

Table 17. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/CRT^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRGs studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (N = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**	**Cn**	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**
0.0 ± 0.0	22.2 ± 11.1	27.8 ± 14.7	22.2 ± 22.2	27.8 ± 14.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Table 18. Tabulated summary of the relative frequency (%) of $FB^+/PNX^+/SOM^+$ cells in the L and the S DRGs examined depending on their diameter. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)					
L			S		
Small	**Medium**	**Large**	**Small**	**Medium**	**Large**
66.6 ± 21.1	33.0 ± 21.1	0.0 ± 0.0	66.6 ± 21.1	33.3 ± 21.1	0.0 ± 0.0

Analysis of the intraganglionic distribution pattern of $FB^+/PNX^+/SOM^+$ neurons has revealed that in the L DRG all of these cells were located in the Cn domain, while in the S DRG such coded neurons were evenly distributed in the Cd and the Cr domains (50 ± 21.8% and 50.0 ± 21.8%, respectively); (Table 19).

Table 19. The relative frequency of $FB^+/PNX^+/SOM^+$ neurons in the particular intraganglionic domains of the L and the S DRGs studied. Data obtained from all the animals studied were pooled and presented as mean ± SEM, referring to the number of animals (*N* = 6).

Segments of the Spinal Cord (%)									
L					S				
Cn	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**	**Cn**	**Cd**	**Cr**	**P**	**Md**
100 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	50.0 ± 21.8	50.0 ± 21.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

3.3.8. The Pattern of Multiple Co-Localization of PNX with Biologically Active Substances in FB^+ Neurons Innervating the Uterine Cervix

Double immunofluorescence technique combined with counting of FB^+/PNX^+ cell profiles on serial consecutive sections allowed the assessment of co-localization of more than two biologically active substances in the same cell, allowing us to draw following conclusions:

(i) The vast majority of $FB^+/PNX^+/CGRP^+$ neurons concurrently contained SP. These neurons also contained PACAP, GAL, CRT, and/or SOM. A significantly smaller number of retrogradely labeled $PNX^+/CGRP^+$ neurons also contained nNOS. In contrast, $FB^+/PNX^+/CGRP^+$ nerve cells containing PACAP, CRT, or GAL constituted a significantly smaller subpopulation.

(ii) CGRP was observed in the largest population of PNX^+/SP^+ sensory neurons supplying the uterine cervix. In contrast, neurons containing nNOS, PACAP, GAL, CRT, and SOM were found in much smaller numbers.

(iii) The most numerous subpopulation of PNX^+/NOS^+ neurons supplying the uterine cervix was that which simultaneously showed immunoreactivity for PACAP. A

slightly smaller subpopulation consisted of retrogradely labeled $PNX^+/nNOS^+/CGRP^+$ neurons, while SP, GAL, and CRT were observed sporadically in such neurochemically coded nerve cells.

(iv) In the case of $FB^+/PNX^+/PACAP^+$ neurons, they most often additionally co-localized CGRP and/or SP. In turn, $PNX^+/PACAP^+$ neurons containing GAL, nNOS, or CRT were observed in much smaller numbers.

(v) In retrogradely labeled PNX^+ sensory neurons, GAL predominantly co-expressed with SP and CGRP. A significantly smaller subpopulation of $FB^+/PNX^+/GAL^+$ neurons also contained PACAP or CRT, while nNOS was observed sporadically in such encoded neurons supplying the uterine cervix.

(vi) The population of PNX^+/CRT^+ UC-SNs predominantly contained SP and CGRP. $FB^+/PNX^+/CRT^+$ neurons containing PACAP or GAL were observed in much smaller numbers, while such encoded neurons additionally containing nNOS were observed sporadically.

(vii) In the case of SOM, it was observed in a very small population of FB^+/PNX^+ neurons, mainly co-occurring with SP and CGRP.

Details concerning the relative percentages of individual subpopulations of retrogradely labeled PNX^+ neurons are shown in Table 20.

Table 20. The relative numbers of individual, differently neurochemically coded subpopulations of PNX^+ sensory neurons supplying the uterine cervix, as determined by the analysis of consecutive serial sections of the DRG studied.

Colocalization Patterns of PNX with Different Neurotransmitters in the Uterine Cervix-supplying DRG Neurons	%
FB^+/PNX^+	4.3 ± 0.7
$FB^+/PNX^+/CGRP^+$	10.4 ± 4.1
$FB^+/PNX^+/SP^+$	5.6 ± 0.8
$FB^+/PNX^+/PACAP^+$	0.2 ± 0.2
$FB^+/PNX^+/GAL^+$	0.2 ± 0.2
$FB^+/PNX^+/CRT^+$	0.6 ± 0.6
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/NOS^+$	5.1 ± 1.5
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/PACAP^+$	1.5 ± 0.2
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/GAL^+$	0.2 ± 0.2
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/CRT^+$	0.3 ± 0.3
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+$	21.3 ± 3.8
$FB^+/PNX^+/SP^+/PACAP^+$	0.3 ± 0.1
$FB^+/PNX^+/SP^+/NOS^+$	0.7 ± 0.3
$FB^+/PNX^+/SP^+/GAL^+$	0.9 ± 0.8
$FB^+/PNX^+/SP^+/CRT^+$	0.8 ± 0.5
$FB^+/PNX^+/SP^+/SOM^+$	0.3 ± 0.3
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/PACAP^+$	11.3 ± 2.2
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/CRT^+$	0.3 ± 0.3
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/SOM^+$	0.3 ± 1.1
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/GAL^+$	3.2 ± 1.2
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/NOS^+$	19.1 ± 3.3
$FB^+/PNX^+/PACAP^+/GAL^+$	0.5 ± 0.0
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/PACAP^+/NOS^+$	1.0 ± 0.1
$FB^+/PNX^+/SP^+/PACAP^+/NOS^+$	0.2 ± 0.2
$FB^+/PNX^+/SP^+/PACAP^+/GAL^+$	0.8 ± 0.8
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/PACAP^+/NOS^+$	8.0 ± 0.8
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/PACAP^+/GAL^+$	0.4 ± 0.3
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/NOS^+/GAL^+$	0.3 ± 0.1
$FB^+/PNX^+/CGRP^+/SP^+/CRT^+/PACAP^+$	0.4 ± 0.4
$FB^+/PNX^+/SP^+/PACAP^+/CRT^+/NOS^+/GAL^+$	0.2 ± 0.1
$FB^+/PNX^+/SP^+/CGRP^+/CRT^+/PACAP^+/NOS^+$	0.4 ± 0.0
$FB^+/PNX^+/SP^+/CGRP^+/CRT^+/PACAP^+/GAL^+$	0.9 ± 0.0

4. Discussion

The uterus and uterine cervix are innervated, in addition to autonomic fibers, also by numerous sensory fibers [21,22]. Axonal tracing techniques combined with immunohistochemistry are used to examine the innervation and the distribution of neuropeptides in these afferent pathways in the rat [23,24], cat [25], as well as in the domestic pig [22,26].

Previous studies, based on injection of the FB tracer into the organ wall, have revealed that the uterine cervix-supplying autonomic and sensory nerve terminals originate from L and S paravertebral ganglia, inferior mesenteric ganglia, paracervical ganglia as well as from DRG of Th10-L4 and S2-S3 levels of the spinal cord [22], which was corroborated by the results of the present study (see above). When the relative frequencies of retrogradely labeled neurons in the particular DRG were taken into consideration, a significant number of traced cells were located in some of the examined L and S DRG, forming specific "sensory supply centers" of the uterine cervix; these were, respectively, DRG L3 and L4 in the L spinal cord, and DRG S3 and S4 in the S spinal cord. On the other hand, only single FB^+ perikarya were found in DRG of the thoracic spinal cord and, in contrast to the results of Wąsowicz and colleagues (1998), also in the L5 DRG [22].

Furthermore, when the tracer was injected into the paracervical region (right side of the uterus), the presence of FB^+ neurons was observed in the ipsilateral DRG of exactly the same levels, strongly corroborating the suggestion that all sensory fibers supply the uterine cervix transit through the paracervical ganglia [22].

When comparing the localization of this population of retrogradely labeled sensory neurons in the spinal ganglia of the rat (L1, L2, L6, S1; [2]), cat (L3, L4, S1–S3; [3]), and the domestic pig (L3, L4, S3, S4; [22], this study), distinct interspecies differences in the involvement of DRG at individual spinal cord levels in the sensory innervation of the uterine cervix can be observed. While in the pig the majority of the uterine cervix-supplying FB^+ neurons were located in the S DRG, with a lesser representation in the L DRG (approximately 64% and 35% of all traced cells, respectively), such cells, receiving sensory stimuli from the rat cervix are located more rostral, and, in the cat, they form a distinct "sensory center" consisting of S1-S3 DRG.

Moreover, in the present study we also attempted to determine whether the uterine cervix-supplying sensory PNX^+ neurons show any tendency towards somatotopic distribution in the individual domains of the ganglia examined (see Figure 1), as previously described for the innervation pattern of the rat hind paw digits, the skin, and other tissues of the cat [27], or the intraganglionic organization of the human [28] or feline DRG [29]. Analysis of the spatial distribution of labeled PNX^+ cells in the subdomains of the studied DRG indicated that the majority of these neurons were located in the Cd domain, which may suggest a rostro-caudal organization of the reproductive organs' innervation. However, further studies using different combinations of retrograde tracers (e.g., FB in combination with FluoroGold, Nuclear Yellow, etc.) are necessary to confirm or refute this hypothesis.

PNX, since its discovery in 2013 [1], has attracted increasing interest due to its involvement in the regulation of sensory and reproductive system functions. As our preliminary results demonstrated the existence of relatively numerous PNX^+ nerve terminals (a significant proportion of which also contained SP, a "marker substance" of afferent fibers) in the uterine cervix wall, especially in the submucosal and muscular layers, this prompted us to conduct detailed tracing and immunochemical studies focused on the neurochemical architecture of the DRG neurons involved in the uterine cervix innervation, with special regard to the pattern(s) of PNX co-occurrence with other neurotransmitters found previously in the porcine DRG cells. In general, approximately 33% of all uterine cervix-supplying afferent neurons located in the lumbosacral DRG were PNX^+ which suggests the significant physiological importance of this neuropeptide in the regulation of cervical function. Furthermore, the co-occurrence of various combinations of other biologically active substances in PNX^+ neurons further indicates the involvement of PNX in the functioning of various regulatory pathways in the organ.

4.1. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and CGRP

The most abundantly represented in the entire population of retrogradely labeled PNX^+ cells, found in the present study, were neurons co-containing CGRP (approximately 81%), constituting a significant portion of all PNX^+ cells in porcine lumbosacral DRG, as shown by previous studies (CGRP co-existence was observed in over 96% of all PNX^+ cells in these ganglia; [16]). CGRP is a neuropeptide released from sensory nerve terminals under inflammatory conditions [30] and plays a key role in nociceptive transmission within the spinal cord [31]. Acting synergistically with SP, CGRP is a potent vasodilator [32,33], contributing to the regulation of blood flow in the female reproductive tract and has been implicated in the process of cervical ripening [34]. In pregnant rats, increased levels of CGRP and its mRNA are observed in the lumbosacral (L6–S1) DRG and spinal cord, while CGRP expression in the cervix itself decreases. Moreover, it has been shown that CGRP mRNA expression in DRG neurons responds to estrogen stimulation in a dose-dependent manner, and this response can be attenuated using estrogen receptor antagonists. These findings collectively suggest that estrogen modulates CGRP expression in lumbosacral sensory neurons, thereby potentially influencing both central and peripheral mechanisms involved in cervical remodeling during parturition [35].

It is also worth mentioning that the percentage of FB^+/PNX^+ cells co-expressing CGRP differed significantly, depending on the spinal cord level—while at the L level such colocalization was observed in approximately 95% of PNX^+ perikarya, at the S level only 42% of PNX^+ cells co-contain simultaneously CGRP. Such a significant difference may suggest a functional heterogeneity of the population of $PNX^+/CGRP^+$ neurons innervating the cervix. The higher percentage of $PNX^+/CGRP^+$ cells at the L level may suggest that this segment of the spinal cord plays a more significant role in processing sensory stimuli related to nociception, blood flow modulation, or neurogenic inflammation in the cervix. In line with our previous findings [16], the majority of $PNX^+/CGRP^+$ cells in the porcine DRG were small-sized neurons, which additionally corroborates the suggestion of their nociceptive nature.

4.2. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and SP

The second-most abundant PNX^+ subpopulation of afferent DRG neurons involved in the sensory innervation of the uterine cervix was the subset of SP co-expressing cells. This is consistent with previous reports regarding the involvement of SP^+ neurons in the innervation of peripheral tissues, including the cervix [36,37]. It has also been suggested that this tachykinin, upon local release, is able to cause neurogenic pain and inflammation [38]. Beyond its well-established role in nociceptive signaling and inflammatory responses, SP has also been implicated in the regulation of pubertal development and female fertility [39]. It has also been shown that the highest concentration of SP is found in the vagina, followed by the uterine cervix, endometrium, and ovaries, and that its levels were significantly reduced during pregnancy in all reproductive organs but, surprisingly, significantly increased after ovariectomy [40]. Interestingly, administration of SP to ovariectomized rats mimics aspects of the neurogenic inflammation observed in the parturient cervix, causing recruitment of immune cells, vasodilation, and plasma extravasation, suggesting that SP may play an important role in cervical maturation [36] and may be involved in tissue rearrangement [38].

In contrast to the uterine cervix of the rat, where SP level declines in the last trimester of pregnancy, an increase in both SP and its mRNA levels is observed in the L6-S1 DRG neurons, with the expression of the latter showing an estrogen dose dependency [35,41,42]. Thus, increase in the estrogen receptor density in the DRG neurons during parturition may lead to an increase in SP synthesis and this peptide, released from cervical sensory nerve endings, binds to NK1 receptors to participate in cervical remodeling [35].

It is also interesting and worth mentioning that the co-occurrence and, consequently, cooperation of PNX and SP in the regulation of reproductive organ functions, including the uterine cervix, seems not to be limited only to the level of peripheral interactions, but both substances, co-occurring in central neurons, may modulate the function of the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis. Known for its involvement in the transmission of pain and proinflammatory stimuli, SP may also influence hypothalamic GnRH secretion, in this way indirectly modulating pituitary and gonadal activities: while on the one hand SP deficiency led to delayed sexual maturation and/or to infertility in females [39], on the other hand the activation of NK1 receptor by SP during the prepubertal period accelerated the onset of sexual maturation, possibly through early activation of kisspeptin-containing neurons [39]. In turn, PNX, a neuropeptide with documented effects on reproduction, regulates GnRH expression and may modulate HPG axis function, affecting follicle maturation, ovulation, and hormonal preparation of the cervix for childbirth. The synergistic action of SP and PNX may therefore "integrate" peripheral signals (e.g., from the cervix) with central neuroendocrine regulation, which is of particular importance during pregnancy, childbirth, as well as the estrous cycle.

4.3. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and nNOS

Three NOS isoforms are expressed in the rat cervix: eNOS, iNOS, and nNOS. In addition, while particularly pronounced expression of eNOS and iNOS has been observed in the uterine body [43], primarily nNOS expression was observed in the ovaries [44]. The presence of nNOS has not only been found in nitrergic nerve terminals of the uterine cervix of both pregnant and non-pregnant women, but also in the intermediate and superficial layers of epithelial cells. Cervical glands and vascular endothelial cells remained free of expression of the enzyme [45]. Increased expression of the nNOS isoform in the uterine cervix structures has been observed during childbirth in humans [46]. Similar phenomena were observed in rodents, where NO induced cervical maturation [47], and its release from this area was also markedly elevated during labor [43]. It seems likely that PNX may participate in the regulatory effects described above by modulating nNOS activity in a currently unknown way.

Changes in the number of nitrergic cells in the DRG neuron population were observed both during development (e.g., in ovine fetuses, the percentage of nitrergic neurons, observed in DRG was 94% on day 60 and dropped to about 30% on day 90 of the fetal life, with no apparent further changes until the postnatal period [48], as well as in response to pathological stimuli (e.g., cutting or crushing of the nerve with a ligature [1,49], respectively); these observations suggest that the presence of nNOS in afferent cells may reflect the role of nitric oxide in the regulation of developmental [48] as well as repair processes, in which this gaseous transmitter plays a neuroprotective role [1,50]. It should be emphasized, however, that nitric oxide, acting as a signaling molecule at both central and peripheral sensory terminals, may play an important role in transmission of visceral sensation [51]. PNX has also been implicated in conveying visceral pain sensations [1]. Thus, since colocalization of PNX and nNOS was observed in the present study in approximately 34% of all retrogradely labeled DRG perikarya, both molecules may collaborate in the trafficking of sensory modalities from pelvic viscera, especially the cervix or uterine body. Also noteworthy is the high degree of colocalization of PNX, nNOS, CGRP, and SP in retrogradely labeled DRG cells supplying the uterine cervix, which implies much more complex mechanisms of nociceptive transmission from the organ than previously thought. However, further research is necessary to thoroughly understand the importance and interactions between these substances in regulating cervical function.

4.4. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and PACAP

The next most abundant population of PNX$^+$ sensory neurons, as shown by double immunofluorescence studies, were neurons containing PACAP (21.4%). PACAP is found mainly in small DRG neurons, where it coexists with other neuropeptides such as CGRP, [52] and in the superficial layers of the posterior horn of the rat spinal cord [53]. In the pig, PACAP was present mainly in small-sized neurons [16], though in the subpopulation subserving the sensory pathway(s) of the uterine cervix—mainly in small- and medium-sized cells. In the rat, PACAP was also found mainly in small neurons, but after axotomy its expression in DRG neurons of each diameter increased very quickly, which may suggest its participation in the early phase of the adaptive response [54]. Although its exact roles in DRG neuronal survival and differentiation are not fully understood as of now, as may be judged from the available literature, PACAP protects neurons from death, stimulates the growth of neural processes, and induces CGRP expression—in a manner that is partly similar to the action of nerve growth factor (NGF) [55]. During pregnancy, PACAP expression shows developmental stage-dependent variability—in rats, an initial increase in PACAP levels is observed, but its expression decreases in late pregnancy [56]. These changes were also reflected on the levels of DRG neurons and the dorsal horns of the spinal cord (PACAP synthesis increased in DRG (L6-S1) neurons while simultaneously decreased in the spinal cord in late pregnancy). Interestingly, PACAP mRNA levels in L6-S1 DRG neurons increased with estrogen treatment [56]. Importantly, under inflammatory conditions, PACAP and its receptor (PAC1) mRNA levels significantly decreased in the uterus [57], while in DRG cells they tend to increase [26], which may indicate its involvement in the neuroimmune response to inflammation in the female reproductive organs. Considering the evidence indicating the neuroprotective and modulatory properties of PNX—including its involvement in visceral pain processing and inflammatory response—it is possible that both peptides participate in the synergistic modulation of neuronal plasticity and nerve regeneration under conditions of stress, injury, or inflammation.

4.5. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and GAL

GAL and its receptors are widely expressed in the central and peripheral nervous system and are involved in an in-deep modulation of neurotransmission in numerous neural pathways [16,58]. GAL$^+$ terminals were also found in numerous peripheral tissues, including reproductive organs [59]. Regarding the galaninergic innervation of the uterine cervix in the rat, few GAL$^+$ terminals were found in the cervical wall, which, as shown by retrograde tracing studies, are peripheral processes of a small group of small-diameter sensory perikarya observed in DRG of L6 and S1 levels [60]. This is well in line with the present study, in which afferent neurons immunoreactive to PNX and GAL were found in a small fraction (7.4%) of exclusively small-sized cells of the lumbosacral DRG. As GAL$^+$ fibers supplying the cervical wall were observed almost exclusively in the myometrium and in the periarterial location, it seems likely that the PNX and GAL tandem controls the function of vascular and nonvascular smooth muscle, as previously suggested for GAL [16,59,61]. However, to fully understand the role of PNX and/or GAL, further studies are necessary, particularly those focusing on the tissue distribution of the PNX receptor (GRP173) and the pharmacological effects of PNX on uterine cervical smooth muscle behavior [59].

Moreover, it should also be noted that GAL expression significantly increases in DRG cells affected by pathological conditions. As shown in the rat, uterine inflammation results in an increase in the density of GAL$^+$ fibers in the myometrium (which is explained by the participation of this substance in the increased activity of the muscle layer, which is supposed to lead to faster removal of inflammatory exudate from the uterine cavity; [62]). In

turn, damage to the integrity of GAL$^+$ neuronal processes, for example, due to extirpation of the uterus (as their target organ), leads to a dramatic increase in the number of sensory cells supplying the organ, which de novo start to synthesize GAL, probably as a neuroprotective substance, allowing the neurons to survive the injury until they find replacement target tissues [42,62]. However, further studies on the plasticity of PNX expression under the above-mentioned conditions are necessary to fully understand its (possible) importance in mitigating the effects of inflammation or physical tissue damage and, consequently, the integrity of sensory neuronal projections [16,61].

4.6. Co-Localization and Putative Physiological Relevance of PNX and CRT

Previous studies have shown that PNX and CRT coexist in a relatively small subpopulation of DRG cells (approximately 10% of all PNX$^+$ neurons), the vast majority of which were small in diameter [16]. In the present study, the sensory neurons coded in this way, retrogradely labeled from the uterine cervix, constituted a marginal subpopulation of all FB$^+$ sensory perikarya examined (approximately 3%). This is somewhat in line with observations made in the rat, in which species CRT$^+$ DRG neurons also constituted about 10% of all spinal ganglia cells. However, it should be emphasized that there are clear interspecies differences both in the distribution of CRT$^+$ neurons in the DRG of individual spinal levels and in the presence of this calcium ion homeostasis regulating protein in neurons belonging to different size classes. However, it should be emphasized that there are clear interspecies differences both in the distribution of CRT$^+$ neurons in the DRG of individual spinal levels and in the presence of this calcium ion homeostasis-regulating protein in neurons belonging to different size classes; while in the rat CRT was found in neurons of both L and S DRG [63], in the pig CRT$^+$ cells were present exclusively in the DRG of L levels. Moreover, in the rat, CRT$^+$ neurons belonged mostly to the class of cells with medium or large diameter, whereas in the pig, CRT was not observed at all in large-diameter perikarya [63]. As it may be judged by the unique pattern of CRT distribution in the spinal cord (including dense fiber networks in Clarke's column and strong staining in superficial laminae, especially lamina II), CRT appears to be involved in the functioning of the nociceptive and proprioceptive pathways [64]. In the rat, CRT-immunoreactive nerves were present in the uterine horns and cervix where they were associated with arteries, uterine smooth muscle, glands, and the epithelium [63]. CRT is also defined as a marker of properly functioning endometrial stroma, and its altered expression may indicate disturbances in endometrial physiology, especially in cases of abnormal uterine bleeding [65].

CRT, synthesized in neurons, may act as a binder of intracellular free calcium, helping to regulate its concentration [66]. It appears that the early high expression of CRT in DRG cells suggests its transient role in the regulation of intracellular calcium ion concentration early in embryonic development, before neurotrophins take over the precise control of calcium homeostasis. This biphasic pattern of CRT expression (between day 11 and 14 of fetal life approximately 75% of all DRG neurons expressed CRT, while around day 17 of fetal life only 8% sensory neurons was still CRT$^+$) may reflect the changing functional needs of developing neurons during the maturation of the nervous system [67,68].

4.7. Co-Localization and Putative Physiological of PNX and SOM

The last, smallest population of retrogradely labeled PNX$^+$ cells observed in this study were neurons additionally expressing SOM, an inhibitory neuropeptide expressed in a small population of DRG neurons in both rat and pig (up to 10% of the whole population of sensory DRG cells [16,69]). Our studies showed that a very small fraction of FB$^+$/PNX$^+$/SOM$^+$ DRG neurons (approximately 0.7%) innervate the uterine cervix in the

pig. Moreover, analyzing the available literature, it is currently almost impossible to assign this fraction of DRG cells and their possible physiological role(s) in the cervix. On the one hand, both SOM and PNX seem to be deeply involved in the transmission and regulation of itch sensation [70,71]: the ablation of primary afferent neurons expressing SOM led to deficits in itch sensation [71], while the intrathecal administration of SOM induced scratching behavior [72]. On the other hand, SOM seems to play an important role in thermal nociception, as mice with conditional deletion of SOM expression in DRG cells showed significantly increased sensitivity to thermal noxious stimuli [73]. However, at present there is a lack of not only data but also any suggestions as to the possible physiological role(s) of SOM and PNX in the sensory supply of the uterine cervix. This clear gap in our knowledge of the functions and physiological significance of individual DRG cell subpopulations requires attention and in-depth research to provide a satisfactory explanation.

4.8. Co-Occurrence Pattern of Multiple Biologically Active Substances in PNX-Containing UC-SNs

In this study, we also attempted to answer the question whether PNX-positive DRG sensory neurons involved in the cervical innervation can simultaneously contain more than two of the analyzed substances. Analysis of the co-occurrence patterns of the studied neurotransmitters, performed on consecutive serial cryostat sections, provided important and new information, expanding our knowledge of the chemical phenotype of sensory neurons innervating the uterine cervix. At the same time, however, the results obtained revealed numerous issues requiring further explanation, which will require in-depth studies of both qualitative and functional nature. Of particular interest is the chemical profile of a large subpopulation of PNX^+ neurons, which conduct sensory information from the uterine cervix. These neurons show diverse combinations of nNOS, PACAP, GAL, CRT, and/or SOM, co-occurring with key sensory transmitters, such as SP and/or CGRP. Although the issue of joint or alternating release of two neurotransmitters by sensory neurons has been described in numerous studies, there is a lack of data on the physiological significance and potential mechanisms of simultaneous release of more transmitters from a single nerve ending to the target tissue. Interpretation of the obtained results is also hampered by the lack of knowledge about specific neuronal subtypes and about the distribution and characteristics of receptors for individual transmitters in effector tissues. Therefore, without further detailed functional studies, it is impossible to clearly link the specific sensory modalities to the particular DRG subpopulations differing in their neurotransmitter profile.

4.9. Unanswered Questions and Possible Further Research Directions Resulting from Present Experiment

(1) Although the coexistence of PNX with substances generally considered to be pain transmitters (e.g., SP, CGRP, GAL, and/or PACAP) strongly supports the authors' hypothesis of the co-participation/modulation of nociceptive transmission by the PNX^+ subpopulation of UC-SNs, it is necessary to conduct studies focusing on the "receptor landscape" of both UC-SNs and their target tissues in the innervated organ. Particular attention should be paid to the TRPV family receptors (especially the TRPV1 and TRPA1 ion channels), as they are not only localized in the uterine cervix of humans and other animal species, but have also been shown to be variably expressed and activated during pregnancy, parturition, and/or pathological conditions of the uterus [74,75]. The need to further explore this issue is supported by data indicating a significant influence of sex hormones on their expression pattern [76]; therefore, examining the co-occurrence of PNX, its receptor (GRP173) and members of the TRP family will allow us to specify and validate the potential role of PNX in the transmission of pain stimuli from the uterine cervix.

(2) Another extremely interesting and potentially very important issue from the clinical point of view is to explain whether, and if so, how the transmission substances released from the sensory endings are able to influence both the behavior (growth and progression) and their microenvironment of uterine cervix tumors. As may be judged from the available literature, interactions between the sensory nervous system and tumors should become the focus of further research, as observations from a growing number of research groups suggest a new and potentially very interesting pathway for pharmacologically influencing the biology of tumors in various organs (for the most recent reviews, see [77–79]. Thus, understanding these relationships and identifying potential pharmacological targets could significantly expand our therapeutic options in the future.

(3) Last, but not least, there is also a great need to conduct in-depth pharmacological studies on the possible interactions of biologically active substances co-occurring in UC-SNs and their combined effects on the target tissues of the studied neurons.

5. Conclusions

To date, there has been little information in the available literature on the neurochemical coding of sensory neurons that use PNX as one of their transmitters [16]. This study, utilizing analysis of the presence of a range of neurotransmitter molecules in serial profiles of PNX^+ DRG cells involved in the sensory supply of the uterine cervix, expands our understanding of the innervation of the genital tract, demonstrating that the chemical coding of the neurons contributing to these neural pathways is much more complex than previously thought. These results imply the need for further research, particularly pharmacological and functional studies, which should allow for a better understanding of the physiological roles and the significance of co-occurring and interacting biologically active substances in the regulating of the uterine cervix function.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells14231847/s1, Table S1: List of primary antisera and secondary reagents used in the study: calcitonin gene related peptide (CGRP), calretinin (CRT), galanin (GAL), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), phoenixin-14 (PNX), somatostatin (SOM), substance P (SP), fluorescein isothiocyanate (FITC), streptavidin (CY3); Table S2: List of antigens used in pre-absorption test.

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

Funding: This study was founded by the Minister of Science under „the Regional Initiative of Excellence Program" granted to M.K.M., A. B was the recipient of the Statutory Fund of the School of Medicine, Collegium Medicum (61.610.008-110), University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation in Olsztyn, Poland (affiliated with the National Ethics Committee for Animal Experimentation, Polish Ministry of Science and Higher Education; decision No. 40/2020 from 22 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lyu, R.M.; Huang, X.F.; Zhang, Y.; Dun, S.L.; Luo, J.J.; Chang, J.K.; Dun, N.J. Phoenixin: A Novel Peptide in Rodent Sensory Ganglia. *Neuroscience* **2013**, *250*, 622. [CrossRef]
2. Yosten, G.L.C.; Lyu, R.M.; Hsueh, A.J.W.; Avsian-Kretchmer, O.; Chang, J.K.; Tullock, C.W.; Dun, S.L.; Dun, N.; Samson, W.K. A Novel Reproductive Peptide, Phoenixin. *J. Neuroendocrinol.* **2013**, *25*, 206. [CrossRef]
3. Kalamon, N.; Błaszczyk, K.; Szlaga, A.; Billert, M.; Skrzypski, M.; Pawlicki, P.; Górowska-Wójtowicz, E.; Kotula-Balak, M.; Błasiak, A.; Rak, A. Levels of the Neuropeptide Phoenixin-14 and Its Receptor GRP173 in the Hypothalamus, Ovary and Periovarian Adipose Tissue in Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *528*, 628–635. [CrossRef]
4. Lyu, R.M.; Cowan, A.; Zhang, Y.; Chen, Y.H.; Dun, S.L.; Chang, J.K.; Dun, N.J.; Luo, J.J. Phoenixin: A Novel Brain-Gut-Skin Peptide with Multiple Bioactivity. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 770. [CrossRef]
5. Stein, L.M.; Tullock, C.W.; Mathews, S.K.; Garcia-Galiano, D.; Elias, C.F.; Samson, W.K.; Yosten, G.L.C. Hypothalamic Action of Phoenixin to Control Reproductive Hormone Secretion in Females: Importance of the Orphan G Protein-Coupled Receptor Gpr173. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2016**, *311*, R489–R496. [CrossRef] [PubMed]
6. Nguyen, X.P.; Nakamura, T.; Osuka, S.; Bayasula, B.; Nakanishi, N.; Kasahara, Y.; Muraoka, A.; Hayashi, S.; Nagai, T.; Murase, T.; et al. Effect of the Neuropeptide Phoenixin and Its Receptor GPR173 during Folliculogenesis. *Reproduction* **2019**, *158*, 25–34. [CrossRef] [PubMed]
7. Kurowska, P.; Mlyczyńska, E.; Wajda, J.; Król, K.; Pich, K.; Guzman, P.; Greggio, A.; Szkraba, O.; Opydo, M.; Dupont, J.; et al. Expression and in Vitro Effect of Phoenixin-14 on the Porcine Ovarian Granulosa Cells. *Reprod. Biol.* **2024**, *24*, 100827. [CrossRef]
8. Mlyczyńska, E.; Kurowska, P.; Wachowska, D.; Grzesiak, M.; Dupont, J.; Rak, A. Phoenixin-14 as a Novel Direct Regulator of Porcine Luteal Cell Functions. *Biol. Reprod.* **2024**, *110*, 154. [CrossRef]
9. Guvenc, G.; Altinbas, B.; Kasikci, E.; Ozyurt, E.; Bas, A.; Udum, D.; Niaz, N.; Yalcin, M. Contingent Role of Phoenixin and Nesfatin-1 on Secretions of the Male Reproductive Hormones. *Andrologia* **2019**, *51*, e13410. [CrossRef]
10. Ullah, K.; ur Rahman, T.; Wu, D.D.; Lin, X.H.; Liu, Y.; Guo, X.Y.; Leung, P.C.K.; Zhang, R.J.; Huang, H.F.; Sheng, J.Z. Phoenixin-14 Concentrations Are Increased in Association with Luteinizing Hormone and Nesfatin-1 Concentrations in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Clinica Chimica Acta* **2017**, *471*, 243–247. [CrossRef] [PubMed]
11. Cundubey, C.R.; Cam, S.D. Serum Phoenixin-14 Levels of Women with Polycystic Ovary Syndrome Increase Proportionally with BMI. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2023**, *27*, 3519–3525. [CrossRef] [PubMed]
12. Qin, Y.; Deng, H.; Liu, L.; Li, M.; Yang, J.; Zhang, C.; Zhou, J.; Xiao, Y. Serum Phoenixin Levels in Girls with Central Precocious Puberty and Premature Thelarche. *Endocrine* **2024**, *87*, 857–865. [CrossRef]
13. Kulinska, K.I.; Andrusiewicz, M.; Dera-Szymanowska, A.; Billert, M.; Skrzypski, M.; Szymanowski, K.; Nowak-Markwitz, E.; Kotwicka, M.; Wołuń-Cholewa, M. Phoenixin as a New Target in the Development of Strategies for Endometriosis Diagnosis and Treatment. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1427. [CrossRef] [PubMed]
14. Kulinska, K.I.; Białas, P.; Dera-Szymanowska, A.; Billert, M.; Kotwicka, M.; Szymanowski, K.; Wołun-Cholewa, M. The Role of Phoenixin in the Proliferation and Migration of Ectopic Epithelial Cells in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2023**, *646*, 44–49. [CrossRef]
15. Lepiarczyk, E.; Bossowska, A.; Majewska, M.; Skowrońska, A.; Kaleczyc, J.; Majewski, M. Distribution and Chemical Coding of Phoenixin-Immunoreactive Nerve Structures in the Spinal Cord of the Pig. *Ann. Anat.* **2020**, *232*, 151559. [CrossRef]
16. Mazur, U.; Lepiarczyk, E.; Janikiewicz, P.; Łopieńska-Biernat, E.; Majewski, M.K.; Bossowska, A. Distribution and Chemistry of Phoenixin-14, a Newly Discovered Sensory Transmission Molecule in Porcine Afferent Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16647. [CrossRef] [PubMed]
17. Swindle, M.M.; Makin, A.; Herron, A.J.; Clubb, F.J.; Frazier, K.S. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet. Pathol.* **2012**, *49*, 344–356. [CrossRef]
18. Janikiewicz, P.; Wasilewska, B.; Mazur, U.; Franke-Radowiecka, A.; Majewski, M.; Bossowska, A. The Influence of an Adrenergic Antagonist Guanethidine (GUA) on the Distribution Pattern and Chemical Coding of Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13399. [CrossRef]
19. Bossowska, A.; Crayton, R.; Radziszewski, P.; Kmiec, Z.; Majewski, M. Distribution and Neurochemical Characterization of Sensory Dorsal Root Ganglia Neurons Supplying Porcine Urinary Bladder. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60* (Suppl. 4), 77–81.
20. Lepiarczyk, E.; Majewski, M.; Bossowska, A. The influence of intravesical administration of resiniferatoxin (RTX) on the chemical coding of sympathetic chain ganglia (SChG) neurons supplying the porcine urinary bladder. *Histochem. Cell Biol.* **2015**, *144*, 479–489. [CrossRef]

21. Puder, B.A.; Papka, R.E. Activation and Circuitry of Uterine-Cervix-Related Neurons in the Lumbosacral Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord at Parturition. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *82*, 875–889. [CrossRef]
22. Wąsowicz, K.; Majewski, M.; Łakomy, M. Distribution of Neurons Innervating the Uterus of the Pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1998**, *74*, 13–22. [CrossRef]
23. Inyama, C.O.; Wharton, J.; Su, H.C.; Polak, J.M. CGRP-Immunoreactive Nerves in the Genitalia of the Female Rat Originate from Dorsal Root Ganglia T11-L3 and L6-S1: A Combined Immunocytochemical and Retrograde Tracing Study. *Neurosci. Lett.* **1986**, *69*, 13–18. [CrossRef]
24. Berkley, K.J.; Robbins, A.; Sato, Y. Functional Differences between Afferent Fibers in the Hypogastric and Pelvic Nerves Innervating Female Reproductive Organs in the Rat. *J. Neurophysiol.* **1993**, *69*, 533–544. [CrossRef]
25. Kawatani, M.; de Groat, W.C. A Large Proportion of Afferent Neurons Innervating the Uterine Cervix of the Cat Contain VIP and Other Neuropeptides. *Cell Tissue Res.* **1991**, *266*, 191–196. [CrossRef]
26. 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] [PubMed]
27. Kausz, M.; Réthelyi, M. Lamellar Arrangement of Neuronal Somata in the Dorsal Root Ganglion of the Cat. *Somatosens. Res.* **1985**, *2*, 193–204. [CrossRef]
28. Sperry, Z.J.; Graham, R.D.; Peck-Dimit, N.; Lempka, S.F.; Bruns, T.M. Spatial Models of Cell Distribution in Human Lumbar Dorsal Root Ganglia. *J. Comp. Neurol.* **2020**, *528*, 1644. [CrossRef] [PubMed]
29. Ostrowski, A.K.; Sperry, Z.J.; Kulik, G.; Bruns, T.M. Quantitative Models of Feline Lumbosacral Dorsal Root Ganglia Neuronal Cell Density. *J. Neurosci. Methods* **2017**, *290*, 116. [CrossRef] [PubMed]
30. Seybold, V.S.; Galeazza, M.T.; Garry, M.G.; Hargreaves, K.M. Plasticity of Calcitonin Gene Related Peptide Neurotransmission in the Spinal Cord during Peripheral Inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *73*, 1007–1014. [CrossRef]
31. Alabbad, S.; Figueredo, N.; Yuan, H.; Silberstein, S. Developments in Targeting Calcitonin Gene-Related Peptide. *Expert. Rev. Neurother.* **2024**, *24*, 477–485. [CrossRef]
32. Brain, S.D.; Williams, T.J.; Tippins, J.R.; Morris, H.R.; MacIntyre, I. Calcitonin Gene-Related Peptide Is a Potent Vasodilator. *Nature* **1985**, *313*, 54–56. [CrossRef]
33. Oliveira, M.A.; Lima, W.G.; Schettini, D.A.; Tilelli, C.Q.; Chaves, V.E. Is Calcitonin Gene-Related Peptide a Modulator of Menopausal Vasomotor Symptoms? *Endocrine* **2019**, *63*, 193–203. [CrossRef]
34. Kirby, L.S.; Kirby, M.A.; Warren, J.W.; Tran, L.T.; Yellon, S.M. Increased Innervation and Ripening of the Prepartum Murine Cervix. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2005**, *12*, 578–585. [CrossRef]
35. Mowa, C.N.; Usip, S.; Storey-Workley, M.; Amann, R.; Papka, R. Substance P in the Uterine Cervix, Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord during Pregnancy and the Effect of Estrogen on SP Synthesis. *Peptides* **2003**, *24*, 761–771. [CrossRef] [PubMed]
36. Collins, J.J.; Usip, S.; McCarson, K.E.; Papka, R.E. Sensory Nerves and Neuropeptides in Uterine Cervical Ripening. *Peptides* **2002**, *23*, 167–183. [CrossRef] [PubMed]
37. Papka, R.E.; Cotton, J.P.; Traurig, H.H. Comparative Distribution of Neuropeptide Tyrosine-, Vasoactive Intestinal Polypeptide-, Substance P-Immunoreactive, Acetylcholinesterase-Positive and Noradrenergic Nerves in the Reproductive Tract of the Female Rat. *Cell Tissue Res.* **1985**, *242*, 475–490. [CrossRef]
38. Dray, A. Chapter 6 Neurogenic Mechanisms and Neuropeptides in Chronic Pain. *Prog. Brain Res.* **1996**, *110*, 85–94. [CrossRef]
39. Simavli, S.; Thompson, I.R.; Maguire, C.A.; Gill, J.C.; Carroll, R.S.; Wolfe, A.; Kaiser, U.B.; Navarro, V.M. Substance P Regulates Puberty Onset and Fertility in the Female Mouse. *Endocrinology* **2015**, *156*, 2313–2322. [CrossRef] [PubMed]
40. Traurig, H.; Saria, A.; Lembeck, F. Substance P in Primary Afferent Neurons of the Female Rat Reproductive System. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1984**, *326*, 343–346. [CrossRef]
41. Mowa, C.N.; Papka, R.E. The Role of Sensory Neurons in Cervical Ripening: Effects of Estrogen and Neuropeptides. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 1249–1258. [CrossRef]
42. Wasowicz, K. Changes in the Expression of Tyrosine Hydroxylase [TH], Dopamine Beta-Hydroxylase [DBH], Galanin [GAL], Vasoactive Intestinal Polypeptide [VIP] and Substance P [SP] in the Uterine Cervix-Projecting Neurons Located in the Lumbar Paravertebral Ganglia of the Pig. *Folia Morphol.* **2003**, *62*, 219–221.
43. Buhimschi, I.; Ali, M.; Jain, V.; Chwalisz, K.; Garfield, R.E. Differential Regulation of Nitric Oxide in the Rat Uterus and Cervix during Pregnancy and Labour. *Hum. Reprod.* **1996**, *11*, 1755–1766. [CrossRef]
44. Luo, Y.; Zhu, Y.; Basang, W.; Wang, X.; Li, C.; Zhou, X. Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 752410. [CrossRef] [PubMed]
45. Ledingham, M.A.; Thomson, A.J.; Young, A.; Macara, L.M.; Greer, I.A.; Norman, J.E. Changes in the Expression of Nitric Oxide Synthase in the Human Uterine Cervix during Pregnancy and Parturition. *Mol. Hum. Reprod.* **2000**, *6*, 1041–1048. [CrossRef] [PubMed]
46. Bao, S.; Rai, J.; Schreiber, J.; Medicine, S.; Louils, M. Brain Nitric Oxide Synthase Expression Is Enhanced in the Human Cervix in Labor. *J. Soc. Gynecol. Investig. JSGI* **2001**, *8*, 158–164. [CrossRef]

47. Chwalisz, K.; Shao-Qing, S.; Garfield, R.E.; Beier, H.M. Cervical Ripening in Guinea-Pigs after a Local Application of Nitric Oxide. *Hum. Reprod.* **1997**, *12*, 2093–2101. [CrossRef]
48. Luo, H.; Cui, S.; Chen, D.; Liu, J.; Liu, Z. Immunohistochemical Detection of Islet-1 and Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Dorsal Root Ganglia (DRG) of Sheep Fetuses during Gestation. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 797–803. [CrossRef]
49. Zhang, X.; Verge, V.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Ju, G.; Bredt, D.; Snyder, S.H.; Hökfelt, T. Nitric Oxide Synthase-like Immunoreactivity in Lumbar Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord of Rat and Monkey and Effect of Peripheral Axotomy. *J. Comp. Neurol.* **1993**, *335*, 563–575. [CrossRef]
50. Zhang, X.; Ju, G.; Elde, R.; Hökfelt, T. Effect of Peripheral Nerve Cut on Neuropeptides in Dorsal Root Ganglia and the Spinal Cord of Monkey with Special Reference to Galanin. *J. Neurocytol.* **1993**, *22*, 342–381. [CrossRef]
51. Morris, R.; Southam, E.; Gittins, S.R.; Garthwaite, J. NADPH-Diaphorase Staining in Autonomic and Somatic Cranial Ganglia of the Rat. *NeuroReport* **1993**, *4*, 62–64. [CrossRef]
52. Mulder, H.; Uddman, R.; Moller, K.; Zhang, Y.Z.; Ekblad, E.; Alumets, J.; Sundler, F. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Expression in Sensory Neurons. *Neuroscience* **1994**, *63*, 307–312. [CrossRef]
53. Moller, K.; Zhang, Y.Z.; Håkanson, R.; Luts, A.; Sjölund, B.; Uddman, R.; Sundler, F. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide Is a Sensory Neuropeptide: Immunocytochemical and Immunochemical Evidence. *Neuroscience* **1993**, *57*, 725–732. [CrossRef]
54. Zhang, Q.; Shi, T.J.; Ji, R.R.; Zhang, Y.; Sundler, F.; Hannibal, J.; Fahrenkrug, J.; Hökfelt, T. Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Dorsal Root Ganglia Following Axotomy: Time Course and Coexistence. *Brain Res.* **1995**, *705*, 149–158. [CrossRef] [PubMed]
55. Lioudyno, M.; Skoglösa, Y.; Takei, N.; Lindholm, D. Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) Protects Dorsal Root Ganglion Neurons from Death and Induces Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) Immunoreactivity in Vitro. *J. Neurosci. Res.* **1998**, *51*, 243–256. [CrossRef]
56. Papka, R.E.; Workley, M.; Usip, S.; Mowa, C.N.; 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*, 743–752. [CrossRef]
57. Jana, B.; Całka, J.; Witek, K. Investigation of the Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) and Its Type 1 (PAC1) Receptor in Uterine Contractility during Endometritis in Pigs. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5467. [CrossRef]
58. Lenschow, C.; Mendes, A.R.P.; Ferreira, L.; Lacoste, B.; Marques, H.; Quilgars, C.; Bertrand, S.S.; Lima, S.Q. A Galanin-Positive Population of Lumbar Spinal Cord Neurons Modulates Sexual Arousal and Copulatory Behavior. *bioRxiv* **2024**, 2022.10.04.5107831. [CrossRef] [PubMed]
59. Papka, R.E.; Traurig, H.H. Galanin-Immunoreactive Nerves in the Female Rat Paracervical Ganglion and Uterine Cervix: Distribution and Reaction to Capsaicin. *Cell Tissue Res.* **1989**, *257*, 41–51. [CrossRef]
60. Papka, R.E.; Newton, B.W.; McNeill, D.L. Origin of Galanin-Immunoreactive Nerve Fibers in the Rat Paracervical Autonomic Ganglia and Uterine Cervix. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1991**, *33*, 25–33. [CrossRef]
61. Stjernquist, M.; Ekblad, E.; Owman, C.; Sundler, F. Immunocytochemical Localization of Galanin in the Rat Male and Female Genital Tracts and Motor Effects in Vitro. *Regul. Pept.* **1988**, *20*, 335–343. [CrossRef]
62. Jana, B.; Całka, J.; Miciński, B. Regulatory Influence of Galanin and Galr1/Galr2 Receptors on Inflamed Uterus Contractility in Pigs. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6415. [CrossRef]
63. Papka, R.E.; Collins, J.; Copelin, T.; Wilson, K. Calretinin-Immunoreactive Nerves in the Uterus, Pelvic Autonomic Ganglia, Lumbosacral Dorsal Root Ganglia and Lumbosacral Spinal Cord. *Cell Tissue Res.* **1999**, *298*, 63–74. [CrossRef]
64. Ren, K.; Ruda, M.A.; Jacobowitz, D.M. Immunohistochemical Localization of Calretinin in the Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord of the Rat. *Brain Res. Bull.* **1993**, *31*, 13–22. [CrossRef] [PubMed]
65. Al Moghrabi, H.; Elkeilani, A.; Thomas, J.M.; Mai, K.T. Calretinin: An Immunohistochemical Marker for the Normal Functional Endometrial Stroma and Alterations of the Immunoreactivity in Dysfunctional Uterine Bleeding. *Pathol. Res. Pract.* **2007**, *203*, 79–83. [CrossRef] [PubMed]
66. Rogers, J.H. Calretinin: A Gene for a Novel Calcium-Binding Protein Expressed Principally in Neurons. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 1343–1353. [CrossRef]
67. Ambrus, A.; Kraftsik, R.; Barakat-Walter, I. Ontogeny of Calretinin Expression in Rat Dorsal Root Ganglia. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1998**, *106*, 101–108. [CrossRef]
68. Larmet, Y.; Dolphin, A.C.; Davies, A.M. Intracellular Calcium Regulates the Survival of Early Sensory Neurons before They Become Dependent on Neurotrophic Factors. *Neuron* **1992**, *9*, 563–574. [CrossRef] [PubMed]
69. Hökfelt, T.; Elde, R.; Johansson, O.; Luft, R.; Nilsson, G.; Arimura, A. Immunohistochemical Evidence for Separate Populations of Somatostatin-Containing and Substance P-Containing Primary Afferent Neurons in the Rat. *Neuroscience* **1976**, *1*, 131–136, IN19–IN24. [CrossRef]

70. Cowan, A.; Lyu, R.M.; Chen, Y.H.; Dun, S.L.; Chang, J.K.; Dun, N.J. Phoenixin: A Candidate Pruritogen in the Mouse. *Neuroscience* **2015**, *310*, 541–548. [CrossRef]
71. Stantcheva, K.K.; Iovino, L.; Dhandapani, R.; Martinez, C.; Castaldi, L.; Nocchi, L.; Perlas, E.; Portulano, C.; Pesaresi, M.; Shirlekar, K.S.; et al. A Subpopulation of Itch-Sensing Neurons Marked by Ret and Somatostatin Expression. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 585–600. [CrossRef] [PubMed]
72. Kardon, A.P.; Polgár, E.; Hachisuka, J.; Snyder, L.M.; Cameron, D.; Savage, S.; Cai, X.; Karnup, S.; Fan, C.R.; Hemenway, G.M.; et al. Dynorphin Acts as a Neuromodulator to Inhibit Itch in the Dorsal Horn of the Spinal Cord. *Neuron* **2014**, *82*, 573–586. [CrossRef] [PubMed]
73. Huang, J.; Polgár, E.; Solinski, H.J.; Mishra, S.K.; Tseng, P.Y.; Iwagaki, N.; Boyle, K.A.; Dickie, A.C.; Kriegbaum, M.C.; Wildner, H.; et al. Circuit Dissection of the Role of Somatostatin in Itch and Pain. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 707–716. [CrossRef]
74. Tingåker, B.K.; Ekman-Ordeberg, G.; Facer, P.; Irestedt, L.; Anand, P. Influence of Pregnancy and Labor on the Occurrence of Nerve Fibers Expressing the Capsaicin Receptor TRPV1 in Human Corpus and Cervix Uteri. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2008**, *6*, 8. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, W.; Drzymalski, D.; Sun, L.; Xu, Q.; Jiao, C.; Wang, L.; Xie, S.; Qian, X.; Wu, H.; Xiao, F.; et al. Involvement of MGluR5 and TRPV1 in Visceral Nociception in a Rat Model of Uterine Cervical Distension. *Mol. Pain* **2018**, *14*, 1744806918816850. [CrossRef]
76. Xie, Z.; Feng, J.; Cai, T.; McCarthy, R.; Eschbach, M.D.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Yi, Z.; Zang, K.; Yuan, Y.; et al. Estrogen Metabolites Increase Nociceptor Hyperactivity in a Mouse Model of Uterine Pain. *JCI Insight* **2022**, *7*, e149107. [CrossRef]
77. Giannaccari, M.; Florindi, C.; Bloise, N.; Moccia, F.; Lodola, F.; Visai, L. TRP Channels and Cancer Modulation: A Voyage beyond Metabolic Reprogramming, Oxidative Stress and the Advent of Nanotechnologies in Targeted Therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2025**, *44*, 240. [CrossRef]
78. Huang, S.; Zhu, J.; Yu, L.; Huang, Y.; Hu, Y. Cancer-Nervous System Crosstalk: From Biological Mechanism to Therapeutic Opportunities. *Mol. Cancer* **2025**, *24*, 133. [CrossRef]
79. Zhi, X.; Wu, F.; Qian, J.; Ochiai, Y.; Lian, G.; Malagola, E.; Zheng, B.; Tu, R.; Zeng, Y.; Kobayashi, H.; et al. Nociceptive Neurons Promote Gastric Tumour Progression via a CGRP-RAMP1 Axis. *Nature* **2025**, *640*, 802–810. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.