

Załącznik IIa



WYDZIAŁ  
MEDYCYNY  
WETERYNARYJNEJ

# AUTOREFERAT

Analiza porównawcza oligodendrocytów w wybranych obszarach mózgowia u norki amerykańskiej (*Neovison vison*), lisa rudego (*Vulpes vulpes*), konia domowego (*Equus caballus*) i bydła domowego (*Bos taurus*).”

**dr Agata Wawrzyniak**

ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII  
KATEDRA ANATOMII I HISTOLOGII ZWIERZĄT  
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ  
UNIwersytet PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Lublin, 2017

Autoreferat został przygotowany zgodnie ze wzorem zamieszczonym na stronie internetowej Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów

## SPIS TREŚCI

<b>1. Imię i Nazwisko.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Doskonalenie zawodowe (wybrane programy).....</b>	<b>4</b>
<b>4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. .. 5 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):.....</b>	<b>5</b>
<b>a) tytuł osiągnięcia naukowego.....</b>	<b>5</b>
<b>b) (autor, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy) ..</b>	<b>6</b>
<b>5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1. BIBLIOMETRYCZNE PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego .....</b>	<b>41</b>
<b>6.3. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe.....</b>	<b>42</b>

### **1. Imię i Nazwisko**

Agata Wawrzyniak

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

#### **Uzyskany tytuł: Magister**

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Kierunek: biologia,

Specjalność: biologia ogólna,

Temat pracy dyplomowej magisterskiej: *„Oddychanie tkankowe u robotnic pszczół w warunkach zatrucia pyretroidem.”*

Promotor: dr hab. Paweł Migula Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach

Data obrony: **09/06/1988r.**

#### **Kwalifikacje pedagogiczne do pracy nauczycielskiej**

**6 czerwca 1990 r.** Akademia Rolnicza w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uzyskany stopień: doktor nauk biologicznych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,

Dyscyplina naukowa: biologia

Specjalność: nauki biologiczne

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Badania rozmieszczenia różnych typów oligodendrogleju i obecności w nich żelaza w wybranych obszarach mózgu szczura.”*

Promotor:

prof. dr hab. Regina Cybulska, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie

Recenzent zewnętrzny:

dr hab. Antoni Gawron, prof. UMCS, Instytut Biologii UMCS w Lublinie

Recenzent zewnętrzny:

Prof. dr hab. Zygmunt Wyrzykowski, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR-T w Olsztynie

Data obrony: **22/09/1998r.**

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

#### **3.1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych**

Od roku 1988 do dnia dzisiejszego - najpierw Akademia Rolnicza, a następnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie na stanowiskach:

**01/10/1988-01/10/1990** - asystent stażysta w Zakładzie Histologii i Embriologii, Instytutu Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie

**01/10/1990-01/11/1998** - asystent mianowany w Zakładzie Histologii i Embriologii, Instytutu Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie

**01/11/1998-28/02/2017** - adiunkt w Zakładzie Histologii i Embriologii Katedry Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

**28/02/2017** – do chwili obecnej – starszy wykładowca w Zakładzie Histologii i Embriologii Katedry Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

#### **3.2. Doskonalenie zawodowe (wybrane programy)**

**19/05/2014-23/05/2014** - University of Pisa, Anatomia degli Animali Domestici, /Pisa / Italy /Włochy *Erasmus Staff Mobility for Training*. W ramach szkolenia zapoznałam się ze stosowanymi technikami immunohistochemicznymi, immunofluorescencyjnymi oraz metodami morfometrycznymi, zapoznałam się z nowymi metodami badania struktur ośrodkowego układu nerwowego, które mogłam wykorzystać w mojej pracy naukowej.

**22/08/2016-26/08/2016** - Uludag University /BURSA, Turcja *Erasmus Staff Mobility for Training*. W ramach szkolenia zapoznałam się z najnowszymi metodami dokomorowomózgowego podawania hormonów. W trakcie pobytu przeprowadziłam pilotażowe badania wpływu dokomorowego podania apeliny na funkcje układu pokarmowego. Zapoznałam się z nową procedurą oznaczania poziomów hormonów we krwi.

*18/09/2017-22/09/2017* - Universidad de Santiago de Compostela, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS), Santiago de Compostela, Hiszpania *Erasmus Staff Mobility for Training*. W ramach szkolenia zapoznałam się z metodami iniekcji hormonów do jądra brzuszno-przyśrodkowego (VMH) oraz jądra łukowatego podwzgórza u myszy i szczurów

*25/09/2017-29/09/2017* - Litwa, Kowno, Lithuanian University of Health Sciences, Department of Anatomy and Physiology *Erasmus Staff Mobility for Training*. W ramach szkolenia zapoznałam się z badaniami parametrów mikrobiologicznych zawartości jelita ślepego u szczurów Wistar.

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego**

Prowadzone przeze mnie badania koncentrują się na strukturach ośrodkowego układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem jednego z typów komórek glejowych – oligodendrocytów. Moim osiągnięciem naukowym, uzyskanym po otrzymaniu stopnia doktora, jako wynik prowadzonych badań i stanowiącym znaczny wkład w rozwój dyscypliny naukowej Histologia, będącym dziełem opublikowanym w całości, jest autorska monografia habilitacyjna 388 pt.: „**Analiza porównawcza oligodendrocytów w wybranych obszarach mózgowia u norki amerykańskiej (*Neovison vison*), lisa rudego (*Vulpes vulpes*), konia domowego (*Equus caballus*) i bydła domowego (*Bos taurus*)**”, wydana przez Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w 2017 roku (ISSN 1899-2374), którą wskazuję jako osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).

**b) (autor, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)**

**Autor: Agata Wawrzyniak**

Pracę opublikowano w Wydawnictwie Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w serii Rozprawy Naukowe, Zeszyt 388, 2017r.

**Recenzenci:**

prof. zw. dr hab. n. biol. Tadeusz Kuder, Zakład Anatomii Prawidłowej i Funkcjonalnej, Instytutu Nauk Medycznych, Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach;

dr hab. Maciej Janeczek, prof. UPWr, Zakład Fizjologii i Biostruktury Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Udział własny: *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), udziale w zebraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich badań laboratoryjnych służących do zebrania wyników badań, statystycznym opracowaniu wyników badań oraz ich pełnej interpretacji, napisaniu manuskryptu pracy. Mój udział procentowy szacuję na 100%*

**Omówienie osiągnięć stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego**

**c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

W ciągu mojej pracy naukowej realizowałam prace badawcze i wnikliwe studia literaturowe odnośnie biologii oligodendrocytów. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci monografii, którą uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

**Wprowadzenie - przedmiot badań**

Przedstawionym celem podjętych badań było porównanie oligodendrocytów (OLGs) u samców i samic, zarówno wybranych gatunków zwierząt, a jednocześnie zaprezentowanie tych komórek glejowych w dziedzinie badań histologicznych. W niniejszej monografii w oparciu o bogatą literaturę światową dokonałam przeglądu cech przypisywanych OLGs, a

następnie udowodniłam, że zaangażowanie tych komórek jest procesem fizjologicznym, który przebiega w podobny sposób przez całe życie osobników i aktywnie oddziałuje na neurony oraz przemiany mieliny u samców i samic.

Dowody przeprowadziłam w oparciu

- wcześniejsze badania tych komórek glejowych prowadzone u samców zwierząt laboratoryjnych
- zbiór informacji dotyczących OLGs
- określenie oddziaływania OLGs w różnych obszarach mózgowia ssaków, w których są one zlokalizowane
- analizę porównawczą u gatunków udomowionych oraz dziko żyjących.

Efektom przeprowadzonych badań jest wnikliwa, analiza porównawcza tych komórek glejowych u samców i samic wybranych gatunków zwierząt, która łączy zagadnienia z dziedziny histologii oraz fizjologii w kontekście roli jaką odgrywają te komórki w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) u ssaków.

## Wstęp

Mózgowie człowieka i zwierząt jest bardzo skomplikowanym biologicznym systemem pod względem cytoarchitektury, sieci neuronalnej, lokalizacji ośrodków funkcjonalnych oraz integracji. W układzie nerwowym ssaków istnieją dwie główne grupy komórek: neurony oraz komórki glejowe. Komórki glejowe są niezmiernie interesujące ze względu na swoją różnorodność i wszechstronność, oraz ich wpływ na podstawowe funkcje neuronów. Podstawową różnicą pomiędzy nimi jest to, że neurony są zdolne do przewodnictwa nerwowego, podczas gdy komórki glejowe takich zdolności nie posiadają. Niezależnie od liczbowego stosunku gleju do neuronów, naukowcy udowodnili, że neuroglej stanowi istotną część mózgowia. OLGs wydają się odgrywać istotną rolę w OUN, a funkcjonowanie mózgowia, należy rozpatrywać na poziomie wzajemnego powiązania i oddziaływania, pomiędzy neuronami i komórkami glejowymi [Baumann i Pham-Dinh 2001, Rajadhyaksha i Manghani 2002, Barres 2008, Garman 2011]. Tkankę glejową nazwano neuroglejem i tą nazwą objęte są wszystkie typy komórek glejowych występujące zarówno w OUN jak i w obwodowym (PNS) układzie nerwowym. W OUN komórki glejowe są reprezentowane przez trzy rodzaje neurogleju pochodzenia ektodermalnego, często określane jako makroglej (astrocyty, OLGs oraz ependymocyty). Ponadto w OUN obecny jest mikroglej, który wywodzi się z mezodermy, a dokładnie z monocytów. W PNS główna klasa gleju reprezentowana jest przez komórki Schwanna – limfocyty oraz glej satelitarny [Baumann i Pham-Dinh 2001; Jessen 2004].

Po raz pierwszy komórki glejowe zostały zaobserwowane w latach 20-tych ubiegłego stulecia przez Santiago Ramon Y Cajala w mózgowiu człowieka [Ramón y Cajal 1913]. Dalsze badania głównie Del Rio-Hortegi w latach 30-tych ubiegłego stulecia przy użyciu srebrzej impregnacji skrawków tkanki nerwowej pozwoliły na wyodrębnienie oprócz astrocytów, OLGs oraz mikrogleju. Badania neurogleju w znacznym stopniu przyczyniły się do zrozumienia interakcji pomiędzy neuronami i komórkami glejowymi na poziomie molekularnym. Ważnym aspektem fizjologii neurogleju jest dowód glejowej pobudliwości, która jest formą komunikacji i modulowania aktywności neuronalnej. Powiązanie działalności neuronów oraz neurogleju jest kluczowym aspektem wszystkich funkcji mózgowia, takich jak myślenie, emocje, które określają naturę ludzi i zwierząt [Baumann i Pham-Dinh 2001, Khan i Rajadhyaksha 2002, Barres 2008].

Najliczniejszą populację ze wszystkich typów komórek glejowych u ssaków stanowią OLGs. Te niewielkie komórki obecne są w substancji białej i szarej OUN, posiadają skąpą ilość wypustek, regularne jądrokomórkowe oraz typowe organela komórkowe w cytoplazmie szczególnie dobrze rozwiniętą siateczką śródplazmatyczną szorstką i specyficznym położonym aparatem Golgiego, który spotykany jest zarówno w obszarze przyjądrowym jak i w wypustkach tych komórek. W latach 70-tych w obrazach mikroskopu elektronowego Mori i Leblond [1970] na podstawie różnej gęstości cytoplazmy wyodrębnili ich trzy typy: o jasnej, średniej i ciemnej cytoplazmie.

Dość długo utrzymywał się pogląd, że OLGs towarzyszą głównie włóknom nerwowym, a ich rola kończy się w momencie zakończenia mielinizacji. W latach 70-tych Ogawa i wsp. [Ogawa i in. 1975] opracowali nową technikę impregnacji tkanki nerwowej z użyciem cyjanku potasowo-srebrowego, która jest wybiórczą metodą wykrywania OLGs. Stosując tą technikę na poziomie mikroskopu świetlnego autorzy zaobserwowali, że te komórki glejowe lokalizują się nie tylko przy włóknach nerwowych, ale również przy neuronach i naczyniach krwionośnych. Podczas rozwoju OUN niezbędna jest wzajemna komunikacja pomiędzy neuronami i OLGs w celu wytwarzania mieliny. Neurony zapoczątkowują czas i wytworzenie osłonki mielinowej, ale sygnały pochodzące od OLGs mają bezpośredni wpływ na wytworzenie osłonki mielinowej. Ponadto OLGs mechanicznie wspomagają neurony w produkcji osłonek mielinowych oraz uczestniczą w inaktywacji neuroprzekazników uwalnianych przez komórki nerwowe. Specyficzne połączenia pomiędzy OLGs i neuronami wskazują, że te rodzaje komórek współpracując ze sobą budują złożoną sieć w układzie nerwowym. Mielina stanowi zasadniczy ewolucyjny postęp ponieważ zwiększa wydajność i szybkość przewodzenia impulsów nerwowych [Verkhatsky 2006].



Ciągła potrzeba mielinizacji aksonu wymaga, dużej liczby nowo powstających OLGs, które muszą być ściśle skorelowane z liczbą zmielinizowanych aksonów [Corfas i in. 2004]. U kręgowców proces mielinizacji OUN rozpoczyna się już w życiu zarodkowym i jest kontynuowany po urodzeniu, a czas jego zakończenia zależy od gatunku zwierzęcia.

Oprócz udziału tych komórek w mielinizacji przypisuje się im rolę w utrzymaniu homeostazy jonów żelaza w OUN. Początkowo obecność żelaza wiązana była przez niektórych autorów z metabolizmem kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), ale wykazano również związek z procesem mielinizacji [Francois i in. 1981]. Badania histochemiczne różnych autorów na przełomie lat 70-tych i 80-tych ubiegłego stulecia wykazały obecność żelaza w OLGs, początkowo w obszarach słabo zmielinizowanych OUN, a następnie w obszarach zarówno słabo jak i mocno zmielinizowanych. OLGs mogą same syntetyzować transferynę, która może stanowić źródło żelaza lub może być dostarczana tym komórkom z krążenia [Francois i in. 1981, Connor i in. 1990, Benkovic i Connor 1993, Burdo i in. 1999]. Żelazo jest niezbędne do mitochondriogenezy, synaptogenezy, mielinizacji włókien nerwowych, oraz do syntezy niektórych enzymów neuronalnych OUN takich jak hydrolaza tyrozyny czy hydrolaza tryptofanu. Drugim źródłem żelaza jest białko ferrytyna [Francois i in. 1981].

OLGs są wielofunkcyjnymi komórkami glejowymi OUN odgrywającymi ważną rolę, zarówno pod względem fizjologicznym jak i patologicznym, zasługując na uwagę w dziedzinie badań związanych z chorobami neurodegeneracyjnym [Uranova i in. 2007, Barres 2008, Franklin i Kotter 2008, Bradl i Lassmann 2010, Heneka i in. 2010, El Waly i in. 2014]. Jako wysoce wyspecjalizowane komórki OUN kręgowców, zapewniają przewodzenie potencjałów czynnościowych neuronom na duże odległości. Nawet najmniejsze zakłócenie tego procesu przyczynia się do powstania wyniszczających chorób neurologicznych, takich jak np stwardnienie rozsiane (MS), choroba Parkinsona (PD), choroba Alzheimera (AD) czy leukodystrofia [Ludwin 2006, Wenning i in. 2008]. Zrozumienie mechanizmów uszkodzenia i śmierci OLGs może przyczynić się do poznania nowych metod terapeutycznych mających na celu zachowanie lub przywrócenie funkcji struktur substancji białej.

Ciało modzelowate (*corpus callosum*) (CC), zwane też spoidłem wielkim mózgu (*commissura magna cerebri*) jest częścią kresomózgowia (*telencephalon*) położonym na dnie szczeliny podłużnej mózgowia i jest największym mostem komunikacyjnym łączącym obie półkule mózgu, w których zlokalizowane są ośrodki wzrokowe, somatosensoryczne oraz ruchowe przetwarzające bodźce z przeciwległych stron ciała. CC jest stosunkowo nowym ewolucyjnie szlakiem międzypółkulowym, ponieważ występują znacznie starsze

filogenetycznie połączenia takie jak spoidło przednie (*commissura anterior*) i spoidło tylne (*commissura posterior*). CC występuje wyłącznie u ssaków łożyskowych. Pozostałe zwierzęta, w tym torbacze i ssaki jajorodne są go pozbawione. W przekroju strzałkowym wyglądem przypomina podkowę, a jego wypukła powierzchnia pokryta jest warstwą istoty szarej. W obrębie CC wyróżnia się: pień (*truncus*), płat (*splenium*), kolano (*genu*) oraz dziób (*rostrum*). Przez CC przechodzi od 200-800 mln włókien nerwowych, co czyni je najszybszą drogą przekazywania informacji. W CC najwyższa liczba OLGs występuje u młodszych osobników, w okresie wczesnego dzieciństwa następuje spadek ich liczby i dopiero około 5 roku życia liczba OLG zaczyna się stabilizować. Na skutek uszkodzenia CC dochodzi do przerwania przekazywania informacji pomiędzy półkulami, co przyczynia się do upośledzenia takich funkcji, jak czytanie, nazywanie czy kontrola ruchów dowolnych [Bercury i Macklin 2015].

Torebka wewnętrzna (internal capsule łac. *capsula interna*) (IC) jest częścią istoty białej, zawierającą aksony szlaków zstępujących i wstępujących, które oddziela jądro ogoniaste (*nucleus caudatus*) i wzgórze (*thalamus*) od jądra soczewkowatego (*nucleus lentiformis*). W IC wyróżnia się 3 części: ramię czołowe (*crus anterior*), kolano (*genu capsulae internae*) oraz ramię potyliczne (*crus posterior*). Ramię czołowe IC znajduje się pomiędzy głową jądra ogoniastego (*caput nuclei caudati*), a skorupą (*putamen*), natomiast ramię potyliczne położone jest pomiędzy wzgórzem (*thalamus*), a gałką bladą (*globus pallidus*). Obydwa ramiona łączą się w miejscu, zbliżenia wzgórza (*thalamus*) do głowy jądra ogoniastego (*caput nuclei caudati*) i tworzą trzecią część IC zwaną kolanem (*genu capsulae internae*). Włókna nerwowe po przejściu przez IC przedłużają się i biegną w kierunku kory mózgu (*cortex cerebri*) tworząc wieniec promienisty dzielący się na cztery części: czołową (*frontalis*), ciemieniową (*parietalis*), skroniową (*temporalis*) i potyliczną (*occipitalis*) [Bear i in. 2007].

Kora mózgu (łac. *cortex cerebri*) (CCER) jest złożoną strukturą zbudowaną z różnego typu neuronów, które zapewniają większość wyższych funkcji poznawczych. OLGs lokalizując się w substancji szarej, towarzyszą głównie ciałom komórek nerwowych. Zewnętrzną warstwę półkul mózgowych (*hemispherium cerebri*) stanowi pofałdowana CCER, która tworzy zakręty (*gyri*) i bruzdy (*sulci*), zawierając głównie ciała komórek nerwowych, budujących istotę szarą (*substantia grisea*). Bruzdy (*sulci*) są zagłębieniami CCER natomiast zakręty (*gyri*) występują na powierzchni CCER. CCER zapewnia prawidłowy przebieg procesów analizy, syntezy oraz integracji docierających do niej bodźców. CCER jest najmłodszą filogenetycznie częścią mózgowia, która wraz z rozwojem

rozrosła się, pofałdowała, osiągając powierzchnię ok. 0,2 m<sup>2</sup> (niektóre źródła podają nawet 2,5 m<sup>2</sup>). U człowieka CCER ma od dwóch do czterech mm grubości [Bear i in. 2007]. Filogenetycznie CCER dzieli się na: korę nową (*neocortex* lub *isocortex*) obecną wyłącznie u ssaków oraz na korę dawną (*paleocortex*) i korę starą (*archicortex*), obecną również u niższych grup kręgowców. Kora nowa (*neocortex*) zaangażowana jest w odbieranie i przetwarzanie wrażeń zmysłowych, planowanie i wykonywanie ruchów dowolnych oraz procesy poznawcze (m.in. pamięć, myślenie, funkcje językowe). Zbudowana jest z sześciu warstw leżących równoległe do powierzchni mózgowia i zawiera około 10-14 miliardów neuronów. Poszczególne warstwy różnią się zawartością i rodzajem komórek nerwowych oraz połączeniami z różnymi strukturami mózgowia. W *neocortex* wyróżnia się następujące warstwy: I-drobinową czyli brzeźną (*lamina molecularis*), II - ziarnistą zewnętrzną (*lamina granularis externa*), III - piramidową zewnętrzną (*lamina pyramidalisexterna*), IV - ziarnistą wewnętrzną (*lamina granularis interna*), V - piramidową wewnętrzną (*lamina pyramidalisinterna*) oraz VI - komórek wielokształtnych (*lamina multiformis*). Najwcześniej kształtują się warstwy głębokie tj. VI oraz V, a następnie kolejno IV, III i II. Około piątego tygodnia życia zarodkowego pojawia się warstwa brzeźna stanowiąca zawiązek warstwy drobinowej I. W trakcie rozwoju, komórki tej warstwy wędrują głębiej i stają się warstwą I - ubogokomórkową. Pomiędzy warstwą brzeźną, a okołokomorową tworzy się warstwa pośrednia z aksonami, z których później powstanie istota biała mózgowia. Warstwa pośrednia zaangażowana jest w odbieranie i przetwarzanie wrażeń zmysłowych, planowanie i wykonywanie ruchów dowolnych oraz procesy poznawcze takie jak pamięć, myślenie, funkcje językowe.

Kora stara (*archicortex*) zaangażowana jest w procesy związane z emocjami, motywacją oraz w powstawanie niektórych rodzajów pamięci. Tworzą ją różne struktury należące do układu limbicznego takie jak hipokamp (*hippocampus*) (Hip) czy węchomózgowie (*rhinencephalon*) [Bear i in. 2007].

Hipokamp (łac. *hippocampus*, Róg Ammona (*Cornu Ammonis*)) (Hip) jest filogenetycznie jednym z najstarszych regionów mózgowia. Nazwa *hippocampus* wywodzi się z greckiego słowa hippokampus (*hippos* oznacza "konie", natomiast *kampos* "konika morskiego"). Makroskopowo wygięta część Hip wykazuje pewne podobieństwo do rogów i stąd jego łacińska nazwa *Cornu Ammonis* - Róg Ammona. Twór hipokampa jest strukturą węchomózgowia (*rhinencephalon*), która rozciąga się od sklepienia CC do brzuszno-przyśrodkowego kąta półkuli mózgowej. Hip tworzą: podpora (*subiculum*), hipokamp właściwy (*hippocampus proper*) zbudowany z czterech pól CA1–CA4 oraz zakręt zębaty

(gyrus *dentatus*) (DG). Pola CA1–CA4, które po raz pierwszy opisał Lorente de Nó R [1934] składają się z czterech warstw: początkowej (*stratum oriens*) (SO), piramidalnej (*stratum pyramidale*) (SP), promienistej (*stratum radiatum*) (SR) oraz jamisto-drobinowej (*stratum lacunosum-moleculare*) (SLM). Podział ten oparty był przede wszystkim na różnicach morfologicznych komórek piramidalnych, które stanowią główną populację neuronów Hip. Oprócz neuronów piramidalnych, owalnych i wielobiegunowych, w Hip znajdują się również komórki gładkie np. OLGs i astrocyty. Uważa się, że Hip pozostaje plastyczny przez cały okres życia i odgrywa kluczową rolę w funkcjach poznawczych, które wydają się być podstawą naszego człowieczeństwa tj. uczestniczy w procesach pamięci i świadomości czyli zdolności do zapamiętania naszej przeszłości, a ponadto pozwalają wyobrażać naszą przyszłość. Ponadto odgrywa istotną rolę w konsolidacji informacji z pamięci krótkotrwałej do pamięci długotrwałej (pamięć opisowa - deklaratywna, epizodyczna) oraz orientacji przestrzennej. Hip uczestniczy w reakcjach behawioralnych organizmu takich jak rozmnażanie, pobieranie pokarmu oraz reakcjach endokrynowych. Wszelkie uszkodzenia tej struktury w znacznym stopniu upośledzają zdolności uczenia się i zaburzą pamięć [El Falougy i in. 2008].

Istota szara środkowa okołowodociągowa (periaqueductal gray matter, łac *substantia grisea centralis*) (PAG) jest obszarem utworzonym przez tkankę nerwową śródmózgowia otaczającą wodociąg mózgowia (*aqueductus cerebri*), zwany wodociągiem Sylwiusza. Na dnie trzeciej komory znajdują się jej wyraźne zgrubienia, a jedno z nich tworzy guz popielaty (położony pomiędzy ciałami suteczkowatymi /*corpus mamillare*/, a skrzyżowaniem nerwu wzrokowego /*chiasma opticum*/), pokryty warstwą tkanki gładkiej. PAG ściśle łączy się z podwzgórzem (*hypothalamus*) i jest dobrze zmielinizowanym obszarem szarej substancji w OUN. PAG budują głównie neurony, naczynia krwionośne, komórki gładkie oraz włókna nerwowe. Region ten jest zaangażowany w reakcje emocjonalne i obronne, zapamiętywanie, oddawanie moczu, wokalizację, uczucia strachu czy lęku. U ludzi PAG podzielony został na trzy regiony: grzbietowy, środkowy i brzuszny [Olszewski i Baxter 1954], u kota na grzbietowy, środkowy i boczny [Liu i Hamilton 1990], a u szczura na cztery: grzbietowy, grzbietowo-boczny, środkowy oraz brzuszno-boczny [Beitz 1985]. PAG połączony jest drogami wstępującymi i zstępującymi, zmielinizowanych włókien nerwowych z CCER, wzgórzem (*thalamus*), podwzgórzem (*hypothalamus*), przodomózgiem (*prosencephalon*), z jądrami pnia mózgowia (*ganglia basales, nuclei basales*) oraz rdzeniem kręgowym (*medulla spinalis*). Dzięki takim połączeniom ten obszar mózgowia wpływa na prawidłową pracę tych ośrodków nerwowych [Lloyd i Murphy 2009].

## Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym, zawarte w autorskiej monografii habilitacyjnej

### Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Analiza aktualnych doniesień literaturowych oraz wyniki badań własnych pozwoliły sformułować następujące hipotezy badawcze:

- a) lokalizację i morfologię OLGs oraz zawartość gleju immunoreaktywnego dla zasadowego białka mieliny MBP
- b) komórkową i regionalną dystrybucję żelaza
- c) określenie poziomu ekspresji białka MBP oraz jego masy cząsteczkowej
- d) ustalenie gęstości oraz rozmiarów OLGs

w obszarach mózgowia mocno zmielinizowanych /spoidło wielkie/ciało modzelowate (CC) i torebka wewnętrzna (IC)/ oraz słabo zmielinizowanych, bogatych w neurony /kora mózgu (CCER), hipokamp brzuszny (Hip) /pole CA1-CA4/ oraz istota szara środkowa okołowodociągowa (PAG)/, u 4 gatunków dorosłych samców i samic: norki amerykańskiej (*Neovison vison*), lisa rudego (*Vulpes vulpes*), konia domowego (*Equus caballus*) i bydła domowego (*Bos taurus*).

Z danych dostępnych w literaturze wiadomo, że OLGs badane były głównie u szczura [Francois i in. 1981, Benkovic i Connor 1993, Berger i Frotscher 1994, Burdo i in. 1999, Nunez i in. 2000, Dai i in. 2003, Chen i in. 2011], myszy [Sturrock 1975, Connor i in. 1993, Dickinson i Connor 1995, 1998, Ozer i in. 2000, Cerghet i in. 2006, Murtie i in. 2007, Vinet i in. 2010, Edgar i in. 2010], świni [Blissman i in. 1996, Jelsing i in. 2006], małp [Francois i in. 1981, Christensen i in. 2007, Dombrowski i in. 2001, Sandell i Peters 2002, Keuker i in. 2003, Peters 2009, Sloane i in. 2003, Sherwood i in. 2006], ludzi [Connor i in. 1990, Connor 1992, Hulet i in. 1999, Pakkenberg I in.2003, Pelvig i in. 2008], walenii [Eriksen i Pakkenberg 2007] i chomika [Jhaveri i in. 1992]. Jak wynika z powyższego zestawienia, zdecydowana większość istniejących danych uzyskana została na modelu gryzoni, małp a niektóre pochodzą również od ludzi. Brak danych literaturowych dotyczących morfologii, lokalizacji oraz gęstości OLGs w odniesieniu do zwierząt drapieżnych /norka amerykańska (*Neovison vison*), lis rudy (*Vulpes vulpes*)/ oraz gospodarskich /koń domowy (*Equus caballus*), bydło domowe (*Bos taurus*)/. Norka należy do rodziny łąsicowatych, lis do rodziny psowatych, koń jest przedstawicielem rodziny koniowatych z rzędu nieparzystokopytnych, natomiast krowa to przedstawiciel rodziny wołowatych z rzędu parzystokopytnych. Badania wybranych

gatunków zwierząt mogą zatem stanowić cenne źródło informacji na temat OLGs w badaniach porównawczych.

**Ad a)** W celu określenia położenia struktur mózgowia, lokalizacji i morfologii OLGs wybranych obszarów OUN posłużono się metodą barwienia Nissla [1894], specyficzną zmodyfikowaną metodą impregnacji tkanki glejowej solami srebra według Ogawy [1975] oraz wykonano pojedyncze barwienie immunofluorescencyjne z użyciem specyficznego przeciwciała przeciwko MBP [LoPresti i in. 1995].

Główne badania OLGs koncentrują się przede wszystkim na młodych osobnikach, u których proces mielinizacji nie został jeszcze zakończony. U starszych osobników badania dotyczyły małp naczelnych, człekokształtnych /goryle (*Gorilla gorilla gorilla*), szympansy (*Pan paniscus*)/, a tylko niektóre ludzi, gryzoni oraz psów. CCER, Hip oraz PAG są obszarami zbudowanymi w głównej mierze z neuronów, naczyń krwionośnych, włókien nerwowych oraz różnych rodzajów komórek glejowych. CC oraz IC to obszary, w których dominują włókna nerwowe, komórki glejowe oraz naczynia krwionośne. Neurony stanowią tu nieliczną populację. Spośród różnych typów neurogleju w OUN OLGs są najliczniejszą populacją komórek i obecne są zarówno w substancji białej jak i szarej mózgowia [Baumann i Pham-Dinh 2001]. OLGs substancji szarej i białej wykazują podobną morfologię, chociaż różnią się lokalizacją względem struktur charakterystycznych dla określonego obszaru mózgowia. W substancji szarej głównie towarzyszą neuronom, naczyniom krwionośnym oraz astrocytom. OLGs towarzyszące neuronom często nazywane są satelitami okołoneuronalnymi. W substancji białej przede wszystkim występują w sąsiedztwie włókien nerwowych, układają się w stosunku do nich równolegle z reguły parami po dwie lub kilka komórek. Oprócz włókien nerwowych w substancji białej najczęściej spotykane są w pobliżu lub bezpośrednio przy naczyniach krwionośnych.

Zastosowanie metody Nissla pozwoliło na podstawie cech morfologicznych, określić rodzaje komórek w badanych obszarach mózgowia. W porównaniu do innych neuroglejów, OLGs posiadają niewielkie okrągłe lub owalne jądro z gęstą, zbitą chromatyną oraz ciemną cytoplazmą. Zazwyczaj OLGs układają się parami, w grupach lub położone są w bliskim sąsiedztwie neuronów i naczyń krwionośnych. W przeciwieństwie do OLGs, astrocyty posiadały okrągłe i blado wybarwione jądro z heterochromatyną zlokalizowaną głównie przy otoczce jądrowej oraz stosunkowo jasną cytoplazmą [Korbo 1999]. W obszarze CCER u samic i samców badanych gatunków widoczna była sześciowarstwowa budowa kory. Idąc od najbardziej zewnętrznej warstwy, leżącej tuż pod oponą mięką mózgowia do najbardziej

wewnętrznej warstwy graniczącej z istotą białą mózgowia. Poszczególne warstwy kory różniły się głównie zawartością oraz rodzajem komórek nerwowych. Ponadto widoczne były towarzyszące OLGs, astrocyty oraz naczynia krwionośne. Obraz histologiczny Hip u norki, lisa, konia oraz bydła nie różnił się od siebie. Na skrawkach wybarwionych metodą Nissla widoczne były cztery obszary, określane w piśmiennictwie jako pola CA1–CA4. Na preparatach u wszystkich badanych gatunków zwierząt widoczna była cytoarchitektonika tego obszaru, a odpowiednie pola i warstwy związane były z lokalizacją neuronów, ich kształtem oraz rozmieszczeniem. W polach CA1–CA4 u samców i samic wszystkich badanych gatunków zwierząt widoczne były 4 warstwy: SO, SP, SR oraz SLM. Różnice w wielkości, kształcie i intensywności barwienia neuronów umożliwiły określenie granic pomiędzy poszczególnymi obszarami. Zarówno u samców jak i samic badanych gatunków zwierząt OLGs układały się w podobny sposób. Najliczniej OLGs były reprezentowane w warstwie SLM oraz SR pola CA2 i CA3. Na preparatach OLGs występowały pojedynczo lub układały się parami, towarzyszyły głównie naczyniom krwionośnym, włóknom nerwowym czasami neuronom. W PAG widoczne były pojedyncze, lub pary OLGs towarzyszące neuronom, astrocytom oraz naczyniom krwionośnym. W obszarach CC i IC, OLGs układały się w charakterystyczne szeregi, po kilka lub kilkanaście lub towarzyszyły licznie reprezentowanym w tym obszarze mózgowia włóknom nerwowym. Gdziekolwiek widoczne były naczynia krwionośne.

Metoda srebrowa pozwala na ścisłą kontrolę całego procesu barwienia i może być stosowana bez jakichkolwiek ograniczeń, nawet wtedy, gdy materiał przechowywany jest długo w formalinie. W badaniach własnych impregnacji tkanki glejowej solami srebra uwidoczniono ciemno brązowe ciała OLGs, od których odchodziły najczęściej ciemne, krótkie, pojedyncze wypustki. OLGs głównie układały się przy neuronach lub w sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Taki obraz uzyskano podczas obserwacji preparatów u samic i samców badanych gatunków zwierząt. W wyniku przeprowadzonych badań przy zastosowaniu wybiórczej i selektywnej metody srebrowej, zaobserwowano u samic i samców w wybranych obszarach OUN podobne rozmieszczenie OLGs. W CCER, OLGs najczęściej lokalizowały się w dolnych warstwach tj. IV-VI. Wiązało się to również z lokalizacją w pobliżu CC bogatego we włókna nerwowe. W obszarze CCER na preparatach impregnowanych solami srebra u badanych gatunków zwierząt, obserwowano różnorodność komórkową pomiędzy poszczególnymi jej warstwami. OLGs rozmieszczone były nierównomiernie, głównie w głębszych warstwach CCER, położonych blisko substancji białej. W powierzchniowych warstwach CCER OLGs występowały tylko pojedynczo u wszystkich badanych gatunków

zwierząt. Obserwacje skrawków CCER u wszystkich samic i samców badanych gatunków zwierząt potwierdziły, że najczęściej OLGs występowały w głębokich warstwach CCER głównie w warstwie V i VI. Ten obszar przylega bezpośrednio do istoty białej i reprezentuje przejście pomiędzy istotą szarą i białą. W impregnowanych skrawkach Hip u norki amerykańskiej, lisa rudego, konia domowego oraz bydła domowego OLGs były nierównomiernie rozłożone i lokalizowały się głównie w miejscach zawierających naczynia krwionośne i włókna zmielinizowane. Obraz histologiczny Hip u badanych gatunków zwierząt nie różnił się od siebie. OLGs obecne były przede wszystkim w warstwie SLM oraz w warstwie SR pola CA2. W polu CA1 OLGs spotykane były sporadycznie. Czasami widoczne były pojedyncze komórki położone przy neuronach, głównie w warstwie SO pola CA3. Najliczniej OLGs reprezentowane były w warstwie SLM. U wszystkich badanych gatunków zwierząt w obszarze Hip, OLGs najczęściej lokalizowały się przy lub w pobliżu naczyń krwionośnych, przy neuronach oraz innych typach komórek glejowych. W obszarze PAG, w skrawkach impregnowanych solami srebra u wszystkich badanych gatunków zwierząt obserwowano podobną ich lokalizację. PAG otaczając wodociąg mózgowia (*aqueductus cerebri*) jest miejscem, w którym funkcjonują i zbiegają się szlaki zstępujących i wstępujących połączeń, odgrywających istotne role i przez to jest ważnym miejscem oddziaływania na wiele obszarów OUN. Do PAG dochodzą wypustki neuronów tworzące drogi nerwowe między innymi z pniem mózgu (*truncus cerebri*), rdzeniem kręgowym (*medulla spinalis*), podwzgórzem (*hypothalamus*) i wzgórzem (*thalamus*) [Muton i in. 2004]. Na preparatach widoczne były różne rodzaje neuronów, a pomiędzy nimi, przy naczyniach krwionośnych lub przy astrocytach lokalizowały się OLGs. Te komórki najczęściej układały się parami, po kilka obok siebie, rzadko pojedynczo. W obszarze CC oraz IC u samic i samców badanych zwierząt OLGs najczęściej tworzyły pary lub po kilka przylegały do włókien nerwowych. Na preparatach widoczne były krótkie wypustki OLGs, a komórki układały się szeregowo, równoległe do pęczków włókien nerwowych. Czasami występowały przy naczyniach krwionośnych lub w pobliżu innych komórek glejowych. Technika impregnacji solami srebra OLGs wykazała ich charakterystyczne ułożenie parami, po kilka najczęściej przy włóknach nerwowych, prawdopodobnie z uwagi na tworzenie osłonki mielinowej. Oprócz OLGs obserwowano wybarwione włókna nerwowe. Wyniki badań własnych w obszarach mocno zmielinizowanych tj. w CC i IC u dorosłych osobników zarówno samic jak i samców sugerują, że OLGs nawet u dorosłych osobników są zdolne do oddziaływania na osłonki mielinowe. Na preparatach nie zaobserwowano różnic w morfologii oraz w lokalizacji OLGs pomiędzy samicami i samcami u badanych gatunków zwierząt.



Aby określić dystrybucję komórkową ekspresji MBP u dorosłych samic i samców w OUN zastosowano barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał przeciw-MBP i wizualizowano przy pomocy wtórnego przeciwciała sprzężonego z rodaminą. Barwienie immunofluorescencyjne na obecność MBP potwierdziło lokalizację OLGs u samców i samic badanych gatunków zwierząt. Na preparatach produkt reakcji widoczny był głównie w OLGs oraz włóknach nerwowych zmielinizowanych we wszystkich badanych obszarach mózgowia. Wyznakowane fluorescencyjnie komórki posiadały intensywnie zielono zabarwione, okrągłe ciało komórkowe, czasami widoczne były krótkie nieliczne, delikatne wypustki. Na wszystkich analizowanych przekrojach mózgowia zarówno u samców jak i samic badanych gatunków zwierząt, wyznakowane fluorescencyjnie MBP-pozytywne OLGs wykazywały podobnie intensywne wybarwienie. Podobne zabarwienie obserwowano we włóknach nerwowych zmielinizowanych. Niebieskie jądra komórkowe identyfikowano dzięki podbarwieniu preparatów DAPI. Immunoreaktywność neuropilu badanych obszarów mózgowia u samców i samic była zależna od liczby MBP - pozytywnych OLGs. W obszarach CCER, Hip oraz PAG u norki, lisa, konia i bydła wyznakowane fluorescencyjnie OLGs wykazywały podobny wzór lokalizacji, a ich intensywność i rozkład pokrywał się ze wzorem lokalizacji obserwowanej w metodzie srebrzej. W obszarach CC i IC u samców oraz samic produkt reakcji widoczny był również we włóknach nerwowych posiadających osłonkę mielinową. Podobnie jak w obszarach o skąpej zawartości włókien nerwowych zmielinizowanych intensywność i rozkład fluorescencyjnie MBP-pozytywnych OLGs pokrywał się ze wzorem lokalizacji obserwowanej w metodzie srebrzej. W preparatach u badanych gatunków zwierząt nie zaobserwowano różnic morfologicznych pomiędzy samicami i samcami.

**Ad b)** W niniejszej pracy podjęto próbę określenia oraz porównania dystrybucji regionalnej i komórkowej żelaza w mózgowiach u dorosłych samic i samców wybranych gatunków zwierząt. Do określenia dystrybucji żelaza w OLGs posłużyła zmodyfikowana metoda histochemiczna wykrywania obecności jonów żelaza według LeVine [1990].

W wyniku zastosowanej reakcji histochemicznej wykrywania obecności żelaza, pojawił się brązowy produkt, który lokalizował się zarówno w cytoplazmie OLGs jak i w ich wypustkach. Odczyn reakcji obecny był również poza OLGs, co najprawdopodobniej odpowiada osłonkom mielinowym. OLGs miały małe, okrągłe ciało, z ciemnobrązową cytoplazmą oraz skąpą ilością wypustek. We wszystkich miejscach produkt reakcji żelaza był brązowy, ponieważ reakcja została wzmocniona przez zastosowanie 3,3'-

dwuaminobenzyny (DAB). U wszystkich badanych gatunków rozmieszczenie OLGs było podobne. Pomiędzy samicami i samcami nie obserwowano różnic w lokalizacji tych komórek oraz w intensywności odczynu histochemicznego obecnego w OLGs, wypustkach i osłonkach mielinowych otaczających włókna nerwowe. W obszarach słabo zmielinizowanych u samic i samców badanych gatunków zwierząt rozmieszczenie OLGs wykazano w bezpośrednim lub bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnych włosowatych oraz neuronów, a obecność w nich żelaza świadczyć może o zaangażowaniu tych komórek w metabolizm żelaza. W tej części mózgowia OLGs najczęściej układały się pojedynczo lub parami. W obszarze CCER OLGs występowały głównie w jej dolnych warstwach /IV –VI/. Pojedyncze OLGs widoczne były w warstwie II i III. Warstwa IV i V wykazywała nieco intensywniejszy odczyn histochemiczny w porównaniu do warstw zlokalizowanych pod oponą mięką. W głębszych warstwach CCER produkt reakcji lokalizował się dodatkowo pomiędzy komórkami, co świadczyłoby o obecności włókien nerwowych w tym obszarze CCER. W CCER OLGs zawierające żelazo były widoczne głównie w warstwach położonych w pobliżu CC i wiele tych komórek lokalizowało się w przy neuronach sugerując, że mogą one brać udział w transporcie żelaza do i z komórek nerwowych. W Hip produkt reakcji histochemicznej podobnie jak w CCER widoczny był w OLGs oraz ich wypustkach, a rozmieszczenie tych komórek glejowych u badanych gatunków zwierząt pokrywało się z ich lokalizacją obserwowaną przy impregnacji solami srebra. Najliczniej OLGs reprezentowane były w warstwie SLM i SR pola CA2 i CA3. W polu CA1 najczęściej OLGs występowały pojedynczo, głównie w warstwie SO lub SR i miały okrągłe lub owalne ciało komórkowe, czasem widoczne były ich krótkie wypustki z produktem reakcji histochemicznej. W PAG dystrybucja żelazo-pozytywnych komórek była bardziej jednorodna. W tym obszarze mózgowia u wszystkich badanych gatunków produkt reakcji histochemicznej widoczny był w OLGs oraz ich wypustkach. Komórki, zawierające produkt reakcji, występowały najczęściej pojedynczo lub w małych grupach, lokalizowały się przy neuronach oraz naczyniach krwionośnych. W badanych skrawkach u zwierząt w obszarach odpowiadających miejscom mocno zmielinizowanym reakcja histochemiczna wykazała obecność licznych brązowo wybarwionych OLGs. W badanych obszarach mózgowia tj. CC i IC, produkt reakcji wykazywały ułożone szeregowo lub w rzędach OLGs. Taka charakterystyczna lokalizacja tych komórek związana jest z ich pełnią funkcją. Rzadko OLGs widoczne były pojedynczo, lokalizowały się przy naczyniach krwionośnych, lecz najczęściej położone były w rzędach pomiędzy zmielinizowanymi włóknami nerwowymi. OLGs były intensywnie wybarwione zgodnie z założeniem, że stężenie żelaza w substancji białej było wyższe niż w miejscach, gdzie dominowała substancja szara. OLGs

wykazywały typową dla nich morfologię. Ciała tych komórek najczęściej miały kształt kulisty, z ciemno wybarwioną cytoplazmą, od którego odchodziły krótkie porozgałęziane wypustki. Rozproszone barwienie tła w postaci małych pierścieni pochodziło najprawdopodobniej od wypustek OLGs. Jądro jeżeli było widoczne, położone było ekscentrycznie. Taka budowa jest typowa dla morfologii OLGs. Odczyn widoczny był we włóknach nerwowych leżących pomiędzy szeregami OLGs. Intensywność odczynu histochemicznego na obecność żelaza była podobna w obszarze CC i IC u samców i samic u wszystkich badanych gatunków zwierząt.

**Ad c)** Ta część doświadczenia miała na celu określenie profilu MBP w wybranych obszarach mózgowia oraz określenie różnic ilościowych zawartości MBP pomiędzy samcami i samicami. W tym celu wykorzystano metodę Western blot do określenia ilości MBP w obszarach OUN u norki, lisa, konia oraz bydła. Metodą wyjściową do elektroforezy i immunoblottingu była zastosowana po raz pierwszy mikrodysekcja, która pozwoliła uzyskać czyste populacje OLGs pochodzące z mózgowia od samic i samców wybranych gatunków zwierząt. W celu ilościowego określenia ekspresji białka MBP w OLGs w obszarze słabo zmielinizowanym /CCER, Hip, PAG/ oraz z przewagą włókien nerwowych /CC, IC/ przeprowadzono rozdział elektroforetyczny /SDS-PAGE/ białek frakcji mielinowych w żelu poliakrylamidowym. Poziom ekspresji białka określono stosując program ImageJ-win32 przy użyciu funkcji "Gel Analysis". Wartości wyrażono jako względne intensywności, grubości, szerokości i głębokości koloru prążków, oceniano densytometrycznie ilość i normalizowano do odpowiednich prążków  $\beta$ -aktyny.

Laserowa mikrodysekcja stanowi cenne narzędzie dostarczające informacji na temat masy cząsteczkowej, modyfikacji struktury oraz gęstości białek. SDS wiąże się z białkami, niszcząc ich naturalną trójwymiarową strukturę, nadając im ujemny ładunek, niezależnie od ich składu aminokwasowego. Użycie białek wzorcowych pozwala na sporządzenie krzywej zależności ruchliwości elektroforetycznej od logarytmu masy cząsteczkowej, na podstawie której można wyznaczyć eksperymentalnie masy cząsteczkowe badanych białek. Ze względu na brak barwy większości białek w świetle widzialnym niezbędne jest ich wybarwienie pozwalające na dalszą analizę jakościową i ilościową. Zastosowana metoda immunodetekcji Western blot pozwoliła dokonać analizy porównawczej mas cząsteczkowych białek u samic i samców wybranych gatunków zwierząt w obszarach mocno i słabo zmielinizowanych OUN. Ponadto przeprowadzona ocena densytometryczna umożliwiła analizę ilościową badanych prążków. Stanowiło to podstawę do określenia czy większa gęstość OLGs przekłada się na

większą zawartość MBP. W badaniach elektroforetycznych frakcji białkowych wykryto pojedyncze prążki, które miały podobny wygląd u samców i samic, natomiast poziom ekspresji MBP był nieznacznie wyższy u samic badanych gatunków zwierząt we wszystkich obszarach mózgowia, co może sugerować występowanie dymorfizmu płciowego OLGs i mieliny u badanych gatunków zwierząt. Frakcje MBP w OLGs samców i samic badanych gatunków zwierząt zawierały izoformy MBP o masie cząsteczkowej - u samców 18,21-18,72 kDa, natomiast u samic 15,87-16,11 kDa. Największą ilość MBP wykazywały obszary CC i IC, nieco mniej posiadały CCER, Hip oraz PAG u badanych gatunków zwierząt. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy płciami. W badaniach własnych nie wykazano znaczących różnic w masie cząsteczkowej MBP, natomiast na podstawie oceny względnej intensywności, grubości, szerokości i głębokości koloru prążków, zaobserwowano różnice poziomu ekspresji białka MBP pomiędzy samcami i samicami u badanych gatunków zwierząt.

**Ad d)** Przy zastosowaniu analizy morfometrycznej i oprogramowaniu LAS V4.7 /Leica Germany/ po raz pierwszy dokonano oceny gęstości OLGs w określonych obszarach mózgowia u samców i samic wybranych gatunków ssaków. Analiza morfometryczna pozwoliła określić średnie długości OLGs/ $\mu\text{m}$  / w długiej osi ciała/, średnie szerokości OLGs/ $\mu\text{m}$  /w krótkiej osi ciała/, średnie obwody i średnice OLGs/ $\mu\text{m}$  oraz średnie pola powierzchni ciał komórek/ $\mu\text{m}^2$  u norki, lisa, konia oraz bydła w badanych obszarach mózgowia samców i samic. Średnie wielkości poszczególnych parametrów morfometrycznych były nieznacznie wyższe u samców w porównaniu do samic badanych gatunków zwierząt w CCER, Hip, PAG, CC i IC. Pomimo, że średnie wielkości były mniejsze u samic analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy samcami i samicami przy założeniu istotności  $p < 0.05$ . Wyniki badań wykazały, że największą (samiec  $8,24 \pm 1,32$ ) i najmniejszą średnią długość/ $\mu\text{m}$  (samice  $6,09 \pm 1,82$ ) posiadały OLGs w CCER u bydła. Największą średnią szerokość/ $\mu\text{m}$  OLGs wykazano u konia w CCER (samice  $8,20 \pm 1,65$ ), natomiast najmniejszą średnią szerokość w Hip u lisa (samice  $6,00 \pm 1,33$ ). Największy średni obwód wykazywały OLGs w IC u konia (samce  $29,54 \pm 3,24$ ), natomiast najmniejszy średni obwód posiadały OLGs w Hip u samic konia ( $19,99 \pm 3,91$ ). Największą średnicę miały OLGs w CCER u lisa (samce  $9,24 \pm 1,59$ ), a najmniejszą wartość w CC u bydła (samce  $6,16 \pm 0,62$ ). Największe średnie pole powierzchni wykazywały OLGs w IC u konia (samce  $69,63 \pm 19,71$ ), a najmniejsze w Hip u bydła (samice  $31,75 \pm 9,46$ ). Analiza statystyczna

nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi obszarami mózgowia oraz pomiędzy samcami i samicami przy założeniu istotności  $p < 0.05$ .

W badaniach własnych gęstość OLGs, pokrywała się z rozkładem wartości mas cząsteczkowych MBP w obszarach mocno i słabo zmielinizowanych u wszystkich badanych gatunków zwierząt. Taka zawartość MBP najprawdopodobniej odzwierciedla stopień dojrzałości mieliny w określonych obszarach mózgowia. Zastosowane metody morfometryczne pozwoliły uzyskać bezstronne wyniki gęstości OLGs w obszarach CCER, Hip, PAG, CC oraz IC. W obserwacjach własnych nie wykazano dymorfizmu płciowego, istotnych statystycznie różnic w gęstości OLGs w badanych obszarach OUN u samców i samic. Średnią gęstość OLGs (średnio 200 komórek w obrębie każdego badanego obszaru mózgowia) u samców i samic wszystkich gatunków zwierząt obliczono w  $\text{mm}^3$ . Gęstość OLGs w istocie białej była z reguły większa u samców w porównaniu do samic badanych gatunków zwierząt. W obszarach słabo zmielinizowanych wykazano, że PAG u samic była charakteryzowana się największą gęstością OLGs, natomiast PAG u samców miała OLGs wykazywały najmniejszą gęstość. W obszarach: CCER, Hip oraz PAG u samców i samic badanych gatunków zwierząt gęstość OLGs wahała się w przedziale od  $83334,03 \pm 15560,01$  do  $164487,33 \pm 23766,74$  w  $\text{mm}^3$ . W CCER u samców największa gęstość OLGs była u konia, natomiast najmniejsza u lisa. U samic największą gęstość tych komórek glejowych obserwowano u norki, a najmniejszą u lisa. Podobne wyniki uzyskano w Hip. W tym obszarze mózgowia gęstość OLGs była również większa u samców w porównaniu do samic, natomiast w CCER wartości były prawie takie same u samców i samic badanych gatunków zwierząt. W obszarze Hip u samców największą gęstość OLGs obserwowano u bydła, a najmniejszą u lisa. U samic w tym obszarze mózgowia najwięcej OLGs występowało u bydła, a najmniej u lisa. W obszarze PAG u samców największą gęstością OLGs wykazano u bydła, a najmniej u lisa. W obszarach CC i IC, gęstość OLGs u samców i samic badanych gatunków zwierząt wahała się w granicach od  $524845,21 \pm 182396,30$  do  $247942,75 \pm 36236,24$  na  $\text{mm}^3$ . W miejscach bogatych we włókna zmielinizowane największą gęstość tych komórek odnotowano w obszarze CC u samic lisa, natomiast najmniejszą w obszarze IC u samic tego samego gatunku. W obszarze CC u samców największą gęstość OLGs obserwowano u konia, najmniejszą u lisa. U samic największą gęstość OLGs odnotowano u lisa, a najmniejszą u norki. Tak duża gęstość OLGs w CC może świadczyć, że ten obszar mózgowia jest najbardziej zaangażowany w proces mielinizacji, a po jej zakończeniu aktywnie uczestniczy we wszystkich przemianach OLGs. W obszarze IC u samców największą gęstość OLGs odnotowano u norki, a najmniejszą u lisa. U samic w tym obszarze mózgowia największą gęstość OLGs posiadała

norka, najmniejszą lis. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi obszarami mózgowia oraz pomiędzy samcami i samicami przy założeniu istotności  $p < 0.05$ .

### **Podsumowanie**

Analiza porównawcza przeprowadzonych badań OLGs u samic i samców norki amerykańskiej (*Neovison vison*), lisa rudego (*Vulpes vulpes*), konia domowego (*Equus caballus*) i bydła domowego (*Bos taurus*) wykazała, że w obszarach słabo i mocno zmielinizowanych mózgowia u samców i samic OLGs nie wykazywały różnic morfologicznych i morfometrycznych, a ich topografia w określonych obszarach mózgowia była podobna u samców i samic badanych gatunków zwierząt. W obszarach mocno zmielinizowanych tj. CC i IC, OLGs układały się w charakterystyczne rzędy i towarzyszyły włóknom nerwowym zmielinizowanym oraz naczyniom krwionośnym. Analiza porównawcza gęstości OLGs u samców i samic badanych gatunków zwierząt wykazała, że obszarem z największą gęstością tych komórek było CC. Przemawia to za stwierdzeniem jak ważną rolę pełni ten obszar OUN u dorosłych osobników niezależnie od płci, w korelacji OLG - włókno mielinowe, nawet po zakończonej mielinizacji. Na podstawie elektroforetycznych profili białka MBP, wykazano jego niejednorodny rozkład w badanych obszarach mózgowia u samic i samców, co sugeruje występowanie dymorfizmu płciowego. Można przypuszczać, że istnieje ścisłe powiązanie OLGs i mieliny u dorosłych osobników, nawet po zakończonej mielinizacji, niezależnie od płci.

W obszarach z przewagą substancji szarej tj. w CCER, Hip oraz PAG, OLGs lokalizowały się głównie przy naczyniach krwionośnych, neuronach czasami towarzyszyły astrocytom. W CCER najczęściej pojedyncze OLGs rozmieszczone były nierównomiernie, a najwięcej ich obserwowano w dolnych warstwach kory w pobliżu CC. W Hip pojedyncze OLGs rozmieszczone były głównie w warstwie SLM i SR pola CA2 i CA3. W tych miejscach Hip OLGs towarzyszyły włóknom nerwowym, naczyniom krwionośnym czasami neuronom lub astrocytom. W PAG OLGs rozmieszczone były w całym obszarze równomiernie i podobnie jak w CCER ich lokalizacja obejmowała głównie neurony oraz naczynia krwionośne. Czasami towarzyszyły innym rodzajom komórek glejowych. Takie rozmieszczenie OLGs, zwłaszcza w obszarach z dużą ilością włókien mielinowych jest dowodem, że komórki te są niezbędne włóknom nerwowym nie tylko u młodych osobników, ale również w dorosłym mózgowiu po zakończonej mielinizacji.

Rozmieszczenie OLGs u obydwu płci może sugerować, że są one w jednakowym stopniu zaangażowane w pełnione przez siebie funkcje. Lokalizacja OLGs w bezpośrednim

lub bliskim sąsiedztwie włókien nerwowych, naczyń krwionośnych włosowatych oraz neuronów i obecność w nich żelaza pozwala wnioskować, że komórki te zawierają żelazo i świadczą o zaangażowaniu w/w komórek w przemiany metaboliczne towarzyszących im neuronów. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa można przypuszczać, że OLGs odgrywają ważną rolę w regulacji homeostazy żelaza. Lepsze poznanie komórkowej i regionalnej dystrybucja żelaza może przyczynić się do zrozumienia procesów, zapewniających homeostazę żelaza w mózgowiu.

Analiza przeprowadzonych badań oraz przegląd piśmiennictwa potwierdza koncepcję, że OLGs niezależnie od płci oraz wieku osobników, odgrywają istotną rolę w metabolizmie włókien nerwowych oraz neuronów. Zaangażowanie tych komórek może być procesem fizjologicznym, który przebiega w podobny sposób przez całe życie osobników i aktywnie oddziałuje na neurony oraz przemiany mieliny. Uzyskane wyniki sugerują, że OLGs pełnią ważną rolę u dorosłych osobników, nawet po zakończonym procesie tworzenia osłonek mielinowych, a przedstawione wyniki mają wartość poznawczą i mogą mieć aspekt praktyczny zwłaszcza w odniesieniu do zwierząt gospodarskich.

W pracach odnoszących się do OLGs brak doniesień, które przedstawiałyby analizę porównawczą OLGs pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt. Przedstawione wyniki badań mogą stanowić podstawę do lepszego poznania i zrozumienia tych komórek glejowych oraz poza wartością poznawczą mogą mieć również aspekt praktyczny z punktu widzenia nauk klinicznych, zwłaszcza w odniesieniu do zwierząt gospodarskich. Lepsze poznanie tych komórek glejowych oraz zrozumienie mechanizmów ich oddziaływania w skomplikowanej sieci połączeń OLG-neuron może okazać się kluczowym elementem w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych wielu chorób neurodegeneracyjnych.

## **Bibliografia**

- Barres B.A. 2008.: The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 60, 430-440.
- Baumann N, Pham-Dinh D. 2001. : Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871-927.
- Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. 2007. :*Neuroscience: Exploring the brain*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams Wilkins 195-199, 694-697. ISBN 0-7817-6003-8.
- Beitz A.J.1985.:The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number,density, orientation, and regional subdivisions. *J. Comp. Neurol.* 237, 445-459.
- Benkovic S.A., Connor J.R. 1993.: Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 338, 97-113.
- Bercury K.K., Macklin W.B. 2015.: Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Cell.Dev.* 32, 447-458

- Berger T., Frotscher M. 1994.: Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J. Neurocytol.* 23, 61-74.
- Blissman G., Menzies S., Beard J., Palmer C., Connor J. 1996.: The expression of ferritin subunits and iron in oligodendrocytes in neonatal porcine brains. *Dev. Neurosci* 18, 274-281.
- Bradl M., Lassmann H. 2010.: Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 37-53.
- Burdo J.R., Martin J., Menzies S.L., Dolan K.G., Romano M.A., Fletcher R.J., Garrick M.D., Garrick L.M., Connor J.R. 1999.: Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat. *Neuroscience.* 93, 1189–1196.
- Cerghet M., Skoff R.P., Bessert D., Zhang Z., Mullins C., Ghandour M.S. 2006.: Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *J. Neurosci.* 26, 1439-1447.
- Chen L., Lu W., Yang Z., Yang S., Li C., Shi X., Tang Y. 2011.: Age-related changes of the oligodendrocytes in rat subcortical white matter. *Anat. Rec.* 294, 487-493.
- Christensen J.R., Larsen K.B., Lisanby S.H., Scalia J., Arango V., Dwork A.J., Pakkenberg B. 2007.: Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. *Anat. Rec. (Hoboken).* 290, 330–340.
- Connor J.R., Benkovic S.A. 1992.: Iron regulation in the brain: Histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann. Neurol.* 32, 51-61.
- Connor J.R., Menzies S.L., St Martin S.M., Mufson E.J. 1990.: Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J. Neurosci. Res.* 27, 595-611.
- Connor J.R., Roskams A.J., Menzies S.L., Williams M.E. 1993.: Transferrin in the central nervous system of the shiverer mouse myelin mutant. *J. Neurosci. Res.* 36, 501–507.
- Corfas G., Velardez M.O., Ko C.P., Ratner N., Peles E. 2004.: Mechanisms and roles of axon–Schwann cell interactions. *J. Neurosci.* 24, 9250–9260.
- Dai X., Lercher L.D., Clinton P.M., Du Y., Livingston D.L., Vieira C., Yang L., Shen M.M., Dreyfus C.F. 2003.: The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *J. Neurosci.* 23, 5846-553.
- Dickinson T.K., Connor J. R. 1995.: Cellular distribution of iron, transferrin, and ferritin in the hypotransferrinemic (Hp) mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 355, 67-80.
- Dombrowski S.M., Hilgetag C.C., Barbas H. 2001.: Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cereb. Cortex.* 11, 975–988.
- Edgar J.M., McCulloch M.C., Montague P., Brown A.M., Thilemann S., Pratola L., Gruenenfelder F.I., Griffiths I.R., Nave K.A. 2010.: Demyelination and axonal preservation in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *EMBO. Mol. Med.* 2, 42-50.
- El Falougy H., Kubikova E., Benuska J. 2008.: The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl. Lek. Listy.* 109, 106-110.
- El Waly B., Macchi M., Cayre M., Durbec P. 2014.: Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front. Neurosci.* 145, 1-22.
- Eriksen N., Pakkenberg B. 2007.: Total neocortical cell number in the mysticete brain. *Anat. Rec. (Hoboken).* 290, 83–95.
- Francois C., Nguyen-Legros J., Percheron G. 1981.: Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains. *Brain. Res.* 215, 317-322.
- Franklin R.J., Kotter M.R. 2008.: The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. *J. Neurol.* 255, 19-25.



- Garman R.H. 2011.: Histology of the central nervous system. *Toxicol. Pathol.* 39, 22-35.
- Heneka M.T., Rodríguez J.J., Verkhratsky A. 2010.: Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 63, 189–211.
- Hulet S.W., Powers S., Connor J.R. 1999.: Distribution of transferrin and ferritin binding in normal and multiple sclerotic human brains. *J. Neurol. Sci.* 165, 48-55.
- Jelsing J., Nielsen R., Olsen A.K., Grand N., Hemmingsen R., Pakkenberg B. 2006.: The postnatal development of neocortical neurons and glial cells in the Gottingen minipig and the domestic pig brain. *J. Exp. Biol.* 209, 1454–1462.
- Jessen K.R. 2004.: Cells in focus Glial cells. *Int J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 1861–1867.
- Jhaveri S., Erzurumlu R.S., Friedman B., Schneider G.E. 1992.: Oligodendrocytes and myelin formation along the optic tract of the developing hamster: an immunohistochemical study using the Rip antibody. *Glia.* 6, 138-148.
- Keuker J.I., Luiten P.G., Fuchs E. 2003.: Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging.* 24, 157-165.
- Khan Y., Rajadhyaksha M.S. 2002.: Glial cells: The other cells of the nervous system. Oligodendrocytes - ensheathers of the CNS. *Resonance* 7, 6-13.
- Korbo L., 1999.: Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 164–168.
- LeVine S.M., Macklin W.B., 1990.: Iron-enriched oligodendrocytes: a reexamination of their spatial distribution. *J. Neurosci. Res.* 26, 508–512.
- Liu R.C., Hamilton B.L. 1990.: Neurons of the periaqueductal gray matter as revealed by Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 186, 403-418.
- LoPresti P., Szuchet S., Papasozomenos S.C., Zinkowski R.P., Binder L.I., 1995.: Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10369–10373.
- Lorente de Nó R. 1934.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol. (Lpz).* 46, 113-117.
- Loyd D.R., Murphy A.Z. 2009.: The Role of the Periaqueductal Gray in the Modulation of Pain in Males and Females: Are the Anatomy and Physiology Really that Different? *Neural. Plasticity.* 12, 462879 doi:10.1155/2009/462879.
- Ludwin S.K. 2006.: The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 305–318.
- Mori S., Leblond C. P. 1970.: Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J. Comp. Neurol.* 139, 1–29.
- Murtie J.C., Macklin W.B., Corfas G. 2007.: Morphometric analysis of oligodendrocytes in the adult mouse frontal cortex. *J. Neurosci. Res.*, 85, 2080–2086.
- Nissl F., 1894.: Über die sogenannten Granula der Nervenzellen. *Neurologisches Centralblatt. Leipzig.* 13, 676–685.
- Nunez J.L., Nelson J., Pych J.C., Kim J.H.Y., Juraska J.M. 2000.: Myelination in the splenium of the corpus callosum in adult male and female rats. *Dev. Brain. Res.* 120, 87–90.
- Ogawa Y., Okado N., Kojima T. 1975.: A new technique of silver impregnation for oligodendrocytes with potassium dicyanoargentate by means of perfusion-fixation method. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 52, 39-50.
- Olszewski J., Baxter D. 1954.: *Cytoarchitecture of the Human Brain.* Lippincott: Philadelphia: JB Lippincott Co. 116-117.
- Ozer E., Sarioglu S., Güre A. 2000.: Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropathol.* 19, 21-25.
- Pakkenberg B., Pelvig D., Marner L., Bundgaard M.J., Gundersen H.J., Nyengaard J.R.,

- Regeur L. 2003.: Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 38, 95–99.
- Pelvig D.P., Pakkenberg H., Stark A.K., Pakkenberg B. 2008.: Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging.* 29, 1754–1762.
- Peters A. 2009.: The effect of normal aging on myelinated nerve fibres in monkey central nervous system. *Frontier Neuroanat.* 3, 1–10.
- Rajadhyaksha M.S., Manghani D. 2002.: Glial cells: The other cells of the nervous system. 1. An introduction to glial cells. *Resonance.* 7, 20–26.
- Ramón y Cajal S. 1913.: Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol.* XI, 225–315.
- Sandell J.H., Peters A. 2002.: Effects of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 445, 13–28.
- Sherwood C.C., Stimpson C.D., Raghanti M.A., Wildman D.E., Uddin M., Grossman L.I., Goodman M., Redmond J.C., Bonar C.J., Erwin J.M., Hof P.R. 2006.: Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 12, 13606–13611.
- Sloane J.A., Hinman J.D., Lubonia M., Hollander W., Abraham C.R. 2003.: Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey. *J. Neurochem.* 84, 157–168.
- Sturrock R.R. 1975.: A quantitative electron microscopic study of myelination in the anterior limb of the anterior commissure in the mouse brain. *J. Anat.* 119, 67–75.
- Uranova N.A., Vostrikov V.M., Vikhrev O.V., Zimina I.S., Kolomeets N.S., Orlovskaya D.D. 2007.: The role of oligodendrocyte pathology in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 537–545.
- Verkhatsky A. 2006.: Patching the glia reveals the functional organisation of the brain. *Pflugers. Arch.* 453, 411–420.
- Vinet J, Lemieux P, Tamburri A, Tiesinga P, Scafidi J, Gallo V, Sík A. 2010.: Subclasses of oligodendrocytes populate the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 31, 425–438.
- Wenning G.K., Stefanova N., Jellinger K.A., Poewe W., Schlossmacher M.G. 2008.: Multiple system atrophy: a primary oligodendroglialopathy. *Ann. Neurol.* 64, 239–246.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **Przebieg działalności naukowej oraz opis wybranych publikacji**

W trwającej od czasów studiów karierze naukowej rozwijałam swoje zainteresowania starając się łączyć zagadnienia dotyczące rozwoju, morfologii, histochemii, cytochemii oraz morfometrii układu nerwowego różnych gatunków zwierząt. Kierunki mojej pracy badawczej wynikają z własnych zainteresowań naukowych i wpisują się w tematykę badań prowadzonych w Zakładzie Histologii i Embriologii. W profilu badawczym, a tym samym w obszarze moich zainteresowań znajdują się budowa neurogleju, który strukturalnie i czynnościowo wiąże się zarówno z OUN jak i z PNS. Prowadzone badania koncentrują się głównie na wykazaniu zmienności morfologicznych i czynnościowych komórek glejowych, lokalizacji neurogleju w obszarach mocno i słabo zmielinizowanych mózgowia w rozwoju postnatalnym zwierząt oraz reaktywności neuronów i neurogleju OUN pod wpływem egzogennych substancji.

#### **5.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**

Po zdaniu egzaminu maturalnego rozpoczęłam studia na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach. Wybraną przeze mnie specjalnością była biologia ogólna. Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach pod kierunkiem dr hab. Pawła Miguli. Dnia 9 czerwca 1988 roku obroniłam pracę magisterską z wynikiem bardzo dobrym. Po uzyskaniu tytułu magistra pracę zawodową rozpoczęłam 1 października 1988r w Zakładzie Histologii i Embriologii, Instytutu Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie na stanowisku asystenta-stażysty. Z dniem 1 października 1990r. decyzją Rektora Akademii Rolniczej w Lublinie zostałam mianowana na stanowisko asystenta w Zakładzie Histologii i Embriologii Instytutu Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie. Szybko opanowałam zakres wiedzy oraz metody badawcze z zakresu histologii zwierząt i aktywnie włączałam się do badań naukowych prowadzonych w Zakładzie. W pierwszym roku mojej pracy zawodowej uczestniczyłam w XV Jubileuszowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Anatomicznego w Katowicach (14-17 września 1989r). Od czasu zatrudnienia moje zainteresowania naukowo-badawcze poszerzyły się na temat budowy struktur OUN, ze szczególnym uwzględnieniem

jednego z typów komórek glejowych – oligodendrocytów (OLGs). W 1990r. odbyłam miesięczny staż z zakresu mikroskopii elektronowej: transmisyjnej i skaningowej, nowoczesnej histochemii oraz komputerowej analizy obrazów u pana Prof. dr hab. Wincentego Kilarskiego z Instytutu Zoologii, Zakładu Cytologii i Histologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje: 5 artykułów naukowych (**II.B.1; II.B.2; II.B.3; II.B.4; II.B.5**) oraz 1 komunikat na konferencji krajowej (**II.D.5**). Sumaryczna liczba punktów MNiSW tych prac, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 23.

Pracę doktorską wykonywałam pod kierunkiem naukowym Prof. dr hab. Reginy Cybulskiej. Przeprowadzone badania obejmowały obserwacje OLGs u samców szczurów rasy Wistar w wieku 90 -120-150 dni, przy pomocy technik mikroskopii świetlnej oraz elektronowej. Na tym etapie doświadczeń zastosowałam metodę impregnacji solami srebra oraz wykonałam skrawki półcienkie, wybarwione błękitem metylenowym, które umożliwiły prześledzenie rozmieszczenia OLGs przy włóknach nerwowych, naczyniach krwionośnych i neuronach w obszarze słabo zmielinizowanym jakim jest kora czołowa (*cortex frontalis*), oraz w obszarach mocno zmielinizowanych tj. w spoidle wielkim (*corpus callosum*) i torebce wewnętrznej (*capsula interna*). W obszarze kory czołowej wykazano asymetryczne ułożenie tych komórek glejowych, natomiast w obszarach mocno zmielinizowanych OLGs rozmieszczone były szeregowo w liczbie 4-6 komórek ciasno ułożonych wzdłuż włókien nerwowych. Takie ułożenie oligodendrogleju sugeruje silne zaangażowanie tych komórek w proces mielinizacji. W obydwu zastosowanych metodach OLGs wykazywały podobny wzór lokalizacji.

Kolejne badania dotyczyły obserwacji skrawków ultracienkich w mikroskopie elektronowym i pozwoliły na wyodrębnienie 3 typów OLGs: o jasnej, średnio gęstej i elektronowo gęstej cytoplazmie. W obszarze kory mózgowej u wszystkich badanych zwierząt widoczne były 3 typy OLGs. Najczęściej obserwowano pojedyncze lub ułożone parami komórki w bezpośrednim lub bliskim sąsiedztwie neuronów, naczyń krwionośnych włosowatych oraz innych komórek glejowych. W obszarach mocno zmielinizowanych widoczne były zarówno OLGs o jasnej, średnio gęstej oraz elektronowo gęstej cytoplazmie, układające się w charakterystyczne szeregi, rzadko występowały pojedynczo i lokalizowały się głównie przy włóknach zmielinizowanych oraz naczyniach krwionośnych. Czasami towarzyszyły astrocytom lub mikroglejowi. Zaobserwowano, że wraz z wiekiem zwierząt doświadczalnych zmieniała się liczba poszczególnych typów OLGs. W osobników najmłodszych (90 dniowych) OLGs o średnio gęstej cytoplazmie stanowiły najliczniejszą

populację tych komórek glejowych, nieco mniej było OLGs o elektronowo jasnej cytoplazmie, natomiast najmniejszą pulę tworzyła grupa OLGs o elektronowo gęstej cytoplazmie. Podobne proporcje 3 typów OLGs obserwowano w przedziale wiekowym 120 dni, natomiast u osobników 150 dniowych obserwowano znaczny wzrost liczby komórek o elektronowo gęstej cytoplazmie. Komórki o elektronowo jasnej cytoplazmie występowały tylko pojedynczo. Zastosowanie metody histochemicznej pozwoliło dokonać analizy zawartości żelaza w tych komórkach glejowych u badanych zwierząt. W wyniku zastosowanej reakcji histochemicznej na obecność żelaza, produkt reakcji lokalizował się w ciele, wypustkach komórek glejowych oraz osłonkach mielinowych. Lokalizacja żelaza w OLGs podkreśla rolę tych komórek glejowych w gospodarce żelazem w obrębie OUN. Rozmieszczenie OLGs w obszarach substancji szarej i białej odpowiadało rozmieszczeniu tych komórek glejowych barwionych metodą srebrową oraz błękitem toluidyny. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były tematem artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu krajowym (**II.B.6; II.B.7; II.B.10, II.B11**) oraz konferencji o zasięgu krajowym (**II.D.1; II.D.9; II.D.10**).

Po złożeniu egzaminów przed Komisją powołaną przez Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie dnia 09 września 1998r odbyła się obrona dysertacji doktorskiej pt. „*Badania rozmieszczenia różnych typów oligodendrogleju i obecności w nich żelaza w wybranych obszarach mózgu szczura*”. Uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi w dniu 22 września 1998r. uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych.

## **5.2. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora**

Doświadczenie zdobyte podczas wykonywania prac badawczych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora oraz podczas realizowania rozprawy doktorskiej pozwoliło mi wypracować własny warsztat badawczy oraz rozwinąć tematykę związaną z OUN, a w szczególności z komórkami glejowymi. Tematyka badawcza po uzyskaniu stopnia doktora, podjęta w moich pracach realizowana była w ramach wcześniej rozpoczętej pracy naukowej dotyczącej reaktywności neuronów i gleju OUN u zwierząt. W trakcie pracy zawodowej opanowałam techniki mikroskopii świetlnej oraz elektronowej, które stanowiły warsztat mojej dalszej pracy. Badania obejmowały analizę mikroskopową tkanki glejowej ze szczególnym uwzględnieniem OLGs i astrocytów w ontogenezie postnatalnej wybranych obszarów mózgowia ssaków. Ponadto prowadzone przeze mnie prace dotyczyły morfologii neuronów,

ich rodzaju oraz rozmieszczenia w OUN uróżnych gatunków zwierząt. Do realizacji celów badawczych wykorzystywałam metody histochemiczne i morfometryczne dotyczące komórek glejowych i neuronów wybranych obszarów mózgowia u różnych gatunków ssaków z uwzględnieniem płci. Rozpoczęty przeze mnie cykl badań przy użyciu metod immunofluorescencyjnych oraz histochemicznych dotyczył wybranych białek związanych z OLGs i mieliną jako markerów w stanach prawidłowych i patologicznych w strukturach układu nerwowego. Poza standardowymi metodami stosowanymi w histologii w swoich badaniach zastosowałam mikrodyskcję oraz immunoblotting, którą wykorzystywałam w pracy habilitacyjnej. Ponadto zajmowałam się tematyką dotyczącą zmienności ekspresji receptora apelinowego i swoistego białka oligodendrogleju u zwierząt. Prowadzone przeze mnie badania z zakresu morfologii komórek glejowych oraz neuronów na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego mózgowia dotyczyły zarówno młodych jak i starzejących się osobników. W pracy badawczej wykorzystywałam skrawki półcienkie oraz ultracienkie w celu dokładnej analizy badanych struktur. Zastosowanie wyżej wymienionych metod pozwoliło wykazać wzrost liczby OLGs o elektronowo gęstej cytoplazmie u starych zwierząt w porównaniu z młodymi osobnikami. Morfologiczne zmiany cechowały niektóre komórki glejowe, neurony oraz osłonki mielinowe. Badania sugerują, że młodsze formy OLGs mogą uczestniczyć w remielinizacji włókien nerwowych, wpływając na polepszenie neuronalnego przewodnictwa nerwowego, natomiast zmiany strukturalne mieliny mogą wpływać na zaburzenia przewodzenia impulsów nerwowych. Glejowe włókienkowe kwaśne białko (GFAP) jest specyficznym markerem astrocytów, drugiego rodzaju gleju obecnego w OUN, który nierozdzielnie związany jest zarówno z OLGs jak i neuronami. Na podstawie analizy immunohistochemicznej w obszarze istoty szarej środkowej (*substantia grisea centralis/ periaqueductal gray /PAG/*) u dorosłych samców szynszyli wykazano równomierny rozkład astrocytów w grzbietowej, grzbietowo-bocznej oraz brzuszno-bocznej części tego obszaru mózgowia. Na podstawie oceny parametrów morfometrycznych stwierdzono obecność największej liczby astrocytów w grzbietowo-bocznej części PAG. Otrzymane wyniki badań sugerują, że akumulacja astrocytów w tej części PAG u dorosłych samców szynszyli może odzwierciedlać ich udział w aktywnym mechanizmie obronnym. Główny nurt mojej pracy badawczej koncentrował się nad zagadnieniami dotyczącymi poznania budowy, topografii oraz morfologii OLGs obszarów słabo zmielinizowanych (kora mózgowia */cortex cerebri/*, hipokamp */hippocampus/*, istota szara środkowa okołowodociągowa */substantia grisea centralis/*) oraz mocno zmielinizowanych (spoidło wielkie */corpus callosum/*, torebka wewnętrzna */capsula interna/*) u różnych gatunków zwierząt. Prace morfologiczne i

morfometryczne prowadzone na poziomie mikroskopu świetlnego należą do poznawczych i stanowią podstawę do dalszych badań nad wpływem substancji egzogennych na funkcjonowanie mózgowia w zwierząt (II.B.12; I.A.3; I.A.4; II.B.15; I.A.6; I.A.7, II.D.1; II.D.9; II.D.10; II.D.11; II.D.12; II.D.13; II.D.14; II.D.28; II.D.32; II.D.36, II.D.41;II.D.42; II.D.2.9.).

Tematyka badawcza prowadzonych przeze mnie prac miała na celu lepsze poznanie budowy, topografii oraz morfologii wybranych obszarów OUN ze szczególnym uwzględnieniem miejsc należących do układu limbicznego takich jak: hipokamp /*hippocampus*/ (Hip), zakręt przyhipokampalny (*gyrus parahippocampalis*), zakręt zębaty (*gyrus dentatus*) i ciało migdałowate (*corpus amygdaloideum*). Hip jest jedną z podstawowych struktur mózgowych u ludzi oraz zwierząt odgrywających istotną rolę w pamięci długoterminowej i orientacji przestrzennej. Badania morfologiczne na poziomie mikroskopu świetlnego pozwoliły dokonać analizy topograficznej, cytoarchitektonicznej oraz morfometrycznej w strukturach układu limbicznego u samców i samic różnych gatunków zwierząt w tym u lisa polarnego (*Arctic fox*), norki amerykańskiej (*Neovison vision*) i bydła domowego (*Bos taurus*). Na preparatach histologicznych w Hip u badanych gatunków zwierząt widoczne były pola CA1–CA4 oraz warstwy: początkowa /*stratum oriens-SO*/, piramidalna /*stratum pyramidale –SP*/, promienista /*stratum radiatum –SR*/ i jamisto-drobinowa /*stratum lacunosum-moleculare –SLM*/. Główną populacją neuronów Hip w SP stanowiły neurony piramidalne z wieloma dendrytami. Ponadto w obrazie mikroskopowym widoczne były neurony owalne, wielobiegunowe oraz towarzyszące im komórki glijowe. Obserwacje morfometryczne w poszczególnych polach CA1-CA4 Hip u badanych gatunków zwierząt wykazały, że neurony różnią się pod względem wielkości, kształtu, pola powierzchni komórki i jądra oraz stosunku jądra do komórki (%), natomiast nie występowały istotne statystycznie różnice dotyczące badanych parametrów. Wartości parametrów morfometrycznych w polach CA1-CA4 Hip u dorosłego lisa polarnego (*Arctic fox*) nie różniły się znacząco. Obserwowano niewielką tendencję do wahań w obrębie wielkości, obwodu i pola powierzchni komórki. Pole powierzchni komórek w polu CA3 było największe i oscylowało wokół  $249,4\mu\text{m}^2$ , natomiast w polu CA2 osiągnęła wartość około  $184,1\mu\text{m}^2$ . W polu CA2 głównymi komórkami były neurony piramidalne, gęsto ułożone z niewielką ilością cytoplazmy ale zmiennym rozmiarem. Największą średnicę posiadały neurony w polu CA2 i CA4 (około  $23,6\mu\text{m}$ ), natomiast najmniejszą w polu CA3 (około  $8,3\mu\text{m}$ ). Procentowy udział neuronów w poszczególnych polach CA1-CA4 warstwy SP nie wykazały istotnych różnic statystycznych. Średnia długość neuronów w obszarach CA1-CA4 nie była istotna

statystycznie ( $p < 0,05$ ). Najmniejszą szerokość miały neurony w polu CA4 (około  $10,4\mu\text{m}$ ), natomiast najdłuższe były w polu CA2. Średnia długość neuronów w obszarach CA1- CA4 nie była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). Analiza morfometryczna u samic norki amerykańskiej (*Neovison vison*) wykazała że w polu CA2 Hip brzuszego, największe pod względem długości ( $15,06\mu\text{m}$ ) i średnicy ( $14,5\mu\text{m}$ ) były neurony piramidalne, natomiast najmniejszą długość ( $8,5\mu\text{m}$ ) oraz średnicę ( $8,6\mu\text{m}$ ) posiadały neurony w polu CA1. Największą średnią wielkość pola powierzchni komórki ( $157,1\mu\text{m}^2$ ) oraz największą średnią wielkość pola powierzchni jądra komórkowego ( $106,1\mu\text{m}^2$ ) posiadały neurony piramidalne w polu CA2. W polach CA1-CA4 wskaźnik jądrowo-komórkowy wahał się w granicach 56,62-67,53%. W obszarze Hip brzuszego u bydła domowego (*Bos taurus*) główną populację neuronów stanowiły neurony piramidalne. Największe neurony obserwowano w polu CA1 ( $22,3\mu\text{m}$ ), a najmniejsze w polu CA4 ( $19,1\mu\text{m}$ ). Średnie wartości obwodu komórek wynosiły w polach: CA1 –  $70,1\mu\text{m}$ , CA2 –  $68,1\mu\text{m}$ , CA3 –  $65,2\mu\text{m}$ , a CA4 –  $64,5\mu\text{m}$ . Największą średnicę wykazywały neurony piramidalne w polu CA1 ( $24,2\mu\text{m}$ ). W polach CA3- -CA4 wartości były zbliżone i wynosiły, odpowiednio: CA3 –  $20,4\mu\text{m}$ , CA4 –  $20,1\mu\text{m}$ . Największą średnią wielkość pola powierzchni komórki ( $274,7\mu\text{m}^2$ ) oraz największą średnią wielkość pola powierzchni jądra komórkowego ( $141,1\mu\text{m}^2$ ) wykazywały neurony w polu CA1. W polach CA1-CA4 wskaźnik jądrowo-komórkowy wahał się w granicach 51-52%. Uzyskane wyniki sugerują innowacyjne podejście do morfometrycznych właściwości Hip u różnych gatunków zwierząt. Badania morfometryczne OUN są uważane za cenne źródło danych w zależności od czynników środowiskowych oraz farmakologicznych i ich wpływu na struktury OUN. Ponadto analiza morfometryczna gwarantuje otrzymywanie coraz to dokładniejszych wyników, które mogą być podstawą lepszego zrozumienia morfologii oraz zmian zachodzących w układzie nerwowym (**I.A.5; II.B.13; I.A.8; I.A.11; I.A.12; II.D.15; II.D.16; II.D.17; II.D.18; II.D.19, II.D.26, II.D.27; II.D.29; II.D.31; II.D.37; II.D.47; II.D.2.7.; II.D.2.8.**).

Równolegle do badań nad strukturami OUN uczestniczyłam w pracach eksperymentalnych we współpracy z Zakładem Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Badania dotyczyły żywieniowych, metabolicznych i hormonalnych uwarunkowań wzrostu oraz rozwoju organizmu zwierzęcego, ze szczególnym uwzględnieniem fizjologicznych mechanizmów rozwoju tkanki kostnej. Ponadto eksperymenty dotyczyły powstawania ewentualnych zaburzeń w aspekcie pre- i postnatalnego oddziaływania czynników hormonalnych, żywieniowych i toksykologicznych oraz funkcjonowania osi jelitowo-kostnej u różnych gatunków zwierząt. Ocenie poddano tkankę



koszną, określono wskaźniki metabolizmu kostnego w warunkach rozwijającej się i ustalonej osteopenii; pre- i postnatalne oddziaływanie takich substancji jak: L-alanylo-L-glutamina, deksametazon,  $\alpha$ -ketoglutaran (AKG),  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomaślan (HMB) na procesy wzrostowe organizmu, strukturę, dojrzewanie i funkcje układu pokarmowego oraz metabolizm i właściwości układu kostno-szkieletowego u różnych gatunków zwierząt.

Badania obejmowały okres płodowy, w którym układ kostnoszkieletowy wraz z towarzyszącą tkanką łączną i mięśniową podlega intensywnym zmianom szczególnie w ostatnich tygodniach ciąży. Wykazano, że nawet najmniejsza ingerencja farmakologiczna upośledza prawidłowe formowanie układu kostnego i następową, funkcjonalną sprawność w okresie neonatalnego i postnatalnego rozwoju organizmu. Deksametazon, syntetyczny glikokortykoid pozbawiony działania mineralokortykosteroidowego oraz diabetogennego jest powszechnie i szeroko stosowany w terapii leczniczej zarówno u ludzi jak i zwierząt wpływając na wzrost i rozwój układu kostnoszkieletowego. Wykazano, że prosięta, które znajdowały się pod wpływem deksametazonu w okresie 3 ostatnich tygodni rozwoju prenatalnego, charakteryzowały się makrosomią i w chwili narodzin posiadały zwiększoną masę badanych kości (ramiennej, udowej i żeber). Podawanie deksametazonu w okresie pierwszych 14 dni życia, hamowało ogólny wzrost masy ciała prosiąt, wzrost i dojrzewanie kości, co miało bezpośrednie przełożenie na zmniejszenie parametrów geometrycznych, mechanicznych, gęstości całkowitej tkanki kostnej i zawartości mineralnej kości oraz parametrów histologicznych beleczek kostnych (**I.A.1; II.D.6**). Wykazano, że słabo zbilansowana dieta, niedożywienie oraz stany stresowe, prowadzą do ujemnego bilansu azotu w organizmie z równoczesnym zahamowaniem wzrostu, natomiast glutamina i AKG mogą przeciwdziałać tym efektom. Zapotrzebowanie na glutaminę wzrasta szczególnie w trakcie intensywnego wzrostu somatycznego, w niedożywieniu, w niedojrzałości neonatalnej oraz w stanach upośledzonej czynności trawiennej. Ponadto wykonano badania wpływu glutaminy i AKG na całkowitą zawartość cholesterolu w surowicy krwi u prosiąt. W wyniku podawania glutaminy i AKG doszło do zmniejszenia całkowitego stężenia cholesterolu oraz frakcji lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), natomiast obserwowano wzrost poziomu frakcji lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) u młodych prosiąt karmionych tylko mlekiem matek w grupie kontrolnej. Ponadto glutamina i AKG wpływały na wzrost poziomu trójglicerydów (TG) w surowicy krwi oraz zmiany w układzie leukocytów (**II.B.9; II.D.7; II.D.2.1**). Wykazano również pozytywny wpływ suplementacji AKG na szybkość wzrostu w odniesieniu do tworzenia kolagenu kostnego podczas pierwszych 70 dni życia u prosiąt, co przedkładało się zwiększoną liczbą beleczek kostnych i zwiększeniem ilości kolagenu.

Suplementacja AKG przyczyniła się również do wzrostu stężenia osteokalcyny - niekolagenowego białka syntetyzowanego przez osteoblasty. Przeprowadzone doświadczenia wykazały anaboliczny wpływ AKG na tkankę kostną po podaniu doustnym, zwiększyły jej minaralizację i w konsekwencji doprowadziły do zwiększenia gęstości kości i gęstości beleczek kostnych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość istnienia połączenia AKG pomiędzy układem trawiennym a układem kostnym, sugerując, że AKG można wykorzystać jako czynnik zapobiegający osteopenii i osteoporozie (**II.B.8; I.A.1; I.A.2; II.D.8; II.D.2.2.; II.D.2.3.**). W kolejnym modelu doświadczalnym oceniano wpływ cynku (Zn) na rozwój kości, parametry mechaniczne, geometryczne oraz histomorfometryczne kości długie u kurcząt brojlerów. Określono poziom stężenia hormonu wzrostu (GH), stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1), osteokalcyny i leptyny, stężenie Zn, miedzi (Cu), wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe) oraz fosforu (P) w surowicy. Wyniki wykazały, że ptaki karmione dietą uzupełnioną w organiczny cynk w 25% udziale zalecanej dawki nie wykazywały zaburzeń ogólnego wzrostu i posiadały niezmienny poziom stężenia GH, leptyny i IGF-1. Stężenie Zn, Cu, Ca, Mg, Fe, P w surowicy nie wykazywało różnic pomiędzy grupami. Zawartość Zn wykryta w kościach w kontroli i grupie z uzupełnionym źródłem organicznym tego pierwiastka również nie różniły się między sobą. Skutkowało to stwierdzeniem, że suplementacja z użyciem Zn wpływa korzystnie na właściwości mechaniczne kości, a tym samym ma korzystny wpływ na rozwój układu kostnego u brojlerów badanych pod kątem czynnika żywieniowo-osteoporotycznego (**I.A.10; I.A.13; II.D.21; ).**

Brałam również udział w cyklu badań, prowadzonych we współpracy z Zakładem Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków oraz Katedrą Epizootiologii i Kliniką Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Celem badań było określenie wpływu mieszanki paszowej wzbogaconej w Zakarpacki zeolit (klinoptylolit) na zużycie paszy i wody, przyrosty masy ciała, jakość mięsa i narządów wewnętrznych oraz odporność brojlerów. Ponadto określono wpływ Zakarpackiego zeolitu na wskaźniki immunologiczne u drobiu przez ocenę ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD na limfocytach T i B, proporcji limfocytów CD4:CD8 i stężenia cytokin Il-2 i Il-10. Do analizy morfologicznej narządów wewnętrznych (wątroba, trzustka, jelito cienkie, żołądki /gruczołowy i mięśniowy/) zastosowano standardowe metody używane w histologii. Ponadto wykonano również ocenę parametrów morfometrycznych wybranych narządów. Wykazano, że zastosowanie naturalnych zeolitów w paszach wspomaga wykorzystanie składników odżywczych, sprzyja lepszym przyrostom masy ciała ptaków przy niższym zużyciu paszy, poprawia jakość mięsa i

funkcje narządów wewnętrznych, wpływając korzystnie na odporność ptaków. Ponadto zmniejsza również ryzyko wystąpienia schorzeń przewodu pokarmowego oraz wspomaga wydalanie z organizmu produktów przemiany materii. Wyniki sugerują, że suplementacja zeolitem zwiększyła spożycie paszy, parametry morfologiczne jelit i aktywność enzymatyczną układu pokarmowego u brojlerów. Stosowanie suplementacji zeolitem ma zalety żywieniowe i sugeruje korzystny wpływ na jakość badanych narządów (**I.A.15; I.A.16.; II.D.24; II.D.2.14.; II.D.2.15.; II.D.2.16.**). Zwiększone stężenie cytokin u kurcząt otrzymujących zeolit wskazuje, że zeolit wpływa na komórki immunokompetentne, regulując natężenie odpowiedzi immunologicznej organizmu. Wykorzystanie zeolitu jako suplementu paszowego zwiększyło prezentację antygeny u brojlerów i powodowało zmiany populacji komórek T i ich funkcji, prowadząc do zwiększonej ekspresji limfocytów T regulatorowych i polaryzacji w kierunku TH1 lub TH2. Nadmierne dostarczanie zeolitu w paszy powodowało miejscową reakcję zapalną, co może prowadzić do uszkodzenia bariery jelitowej i wtórnych infekcji. Wyniki wskazują, że w badanych dawkach dodatek 2% zeolitu do paszy jest najbardziej korzystny dla drobiu pod względem zdrowia, wydajności i odporności (**I.A.14; II.D.33**).

Równolegle do badań nad Zeolitem uczestniczyłam w pracach eksperymentalnych dotyczących gruźlicy u ptaków i ryb akwariowych, we współpracy z Zakładem Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków oraz z Zakładem Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Ptasia gruźlica jest jedną z najważniejszych chorób występujących u różnych gatunków ptaków i najczęściej wywoływana jest przez *Mycobacterium avium*. Badania przeprowadzono na samcach i samicach bażanta złocistego, gołębia, kogutach, pawiach oraz 40 alpakach. Objawy kliniczne i zmiany patologiczne były zróżnicowane w zależności od gatunku. U ptaków w ostatnich trzech tygodniach życia obserwowano zdecydowanie mniejszy apetyt, skutkiem czego było wyraźne wychudzenie, prowadzące do postępującej utraty masy ciała. Ptaki były apatyczne, ich pióra nastroszone, bez połysku, a w ostatnim tygodniu życia wystąpiła u nich depresja i dramatyczna utrata koordynacji. Jedynie u pawia wystąpiło niewielkie osłabienie, natomiast u złotych bażantów nastąpił nagły zgon. Przeprowadzone badanie makroskopowe wykazały powiększenie narządów wewnętrznych oraz zmiany w postaci guzków w wątrobie i śledzionie. Zmiany histopatologiczne były typowe dla ziarniniaków gruźlicy u ptaków. Liczne ziarniniaki obserwowano w wątrobie, śledzionie, jelicie cienkim, jelicie ślepym, nerkach, tchawicy i jądrach, charakteryzowały się centralną serowatą martwicą, otoczoną warstwą komórek nabłonka, wielojądrzastymi gigantycznymi komórkami Langhansa i makrofagami. Limfocyty i

makrofagi znajdowały się na obrzeżach ziarniaków. Badanie histopatologiczne wątroby wykazało liczne ogniska zapalenia ziarniniakowego. Losowo rozproszone ziarniaki składały się z grubej, luźno utkanej otoczki utworzonej przez wrzecionowatego kształtu fibrocyty, makrofagi i wielojądrzaste komórki Langhansa. W tchawicy występowały liczne małe ziarniaki i małe guzki, głównie w blaszce właściwej błony śluzowej. Nerki miały małe ziarniaki charakteryzujące się centralnym obszarem martwicy otoczone przez wielojądrzaste komórki oraz bardzo dużym ziarniakiem (zwłaszcza w torebce nerki) zawierającym liczne duże ogniska martwicze. Zmiany w jądrach charakteryzowały się naciekami limfocytarnymi, widoczne były pogrubione ściany naczyń krwionośnych pomiędzy kanalikami nasiennymi. Ponadto, wykazano zmiany skórne spowodowane mykobakteriozą u badanych ptaków. Obserwacje wykazały wieloprzepustową oporność na gatunki *Mycobacterium* u zakażonych ptaków. Biorąc pod uwagę oporność leków pierwszego rzutu w medycynie ludzkiej przeciwko gruźlicy oraz brak odpowiednich przesłanek naukowych w celu skutecznego leczenia ptaków, należy zmniejszyć ryzyko zarażenia właścicieli ptaków. Ponadto istnieje możliwość przenoszenia zarażonych szczepów na inne ptaki. Zwalczanie mykobakteriozy powinno opierać się na identyfikacji i eliminowaniu lub stałej segregacji zakażonych ptaków. Dbłość o higienę osobistą po kontakcie z zakażonymi ptakami, ich odchodami oraz innymi potencjalnie skażonymi materiałami jest zawsze niezbędna do zminimalizowania narażenia na działanie *Mycobacterium* (I.A.9).

Kolejna praca z moim współautorstwem, która ukazała się w 2017 roku dotyczyła identyfikacji i rozróżniania czterech gatunków rodzaju *Mycobacterium*: *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium fortuitum* i *Mycobacterium abscessus* u ozdobnych ryb akwariowych (*Trichogaster lalius*, *Labidochromis caeruleus*, *Mikrogeophagus ramirezi* i *Paracheirodon innesi*) oraz wykazanie skutków zarażenia ludzi mykobakteriozą pochodzącą od chorych ryb akwariowych. Przeprowadzona analiza histopatologiczna wykazała liczne widoczne ziarniaki w narządach wewnętrznych tylko u *Trichogaster lalius*. Wszystkie gatunki *Mycobacterium* wyizolowane w tym badaniu są dobrze znanymi czynnikami chorobotwórczymi u ludzi i ryb. Przeprowadzone badanie wykazało również, że MALDI-TOF-MS, jako szybka i dokładna technika, może być alternatywnym narzędziem diagnostycznym do identyfikacji i różnicowania klinicznych izolatów prątkowych. Ponadto wykazano, że MALDI Biotyper jest szybką techniką klasyfikacji taksonomicznej różnych gatunków prątków gruźlicy (I.A.18; II.D.34).

W moim dorobku publikacyjnym znajdują się również badania z zakresu histologii gonady męskiej szczura w eksperymentalnie wywołanej cukrzycy, prowadzone we współpracy z

Lwowskim Narodowym Uniwersytetem Medycznym im. Daniela Halickiego (National Medical University, L'viv, Ukraine) oraz Katedrą Anatomii Człowieka, Zakładem Anatomii Prawidłowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Efektem tych badań było wykazanie, że angiopatia jest mechanizmem wyzwalającym rozwój cukrzycy, przyczyniającym się do rozwoju zmian strukturalnych w obrębie gonady męskiej. Stanowi to podstawę do dalszych badań morfologicznych i klinicznych w celu diagnostyki cukrzy oraz opracowania nowych technik leczenia gonady męskiej **(II.B.14)**.

Byłam również współautorem publikacji, w której na podstawie badań cytogenetycznych i molekularnych przedstawiono charakterystykę genetyczną świń rasy Puławskiej. Wśród markerów chromosomowych uwzględniono polimorficzne warianty specyficznych struktur chromosomowych, takich jak centromeryczne obszary heterochromatyczne (pasma C) i regiony organizacyjne nukleotydów (pasma NOR). Opisane tendencje specyficzne dla ras dotyczących polimorfizmu wielkości tych struktur są źródłem znaczników chromosomowych przydatnych do identyfikowania powiązań z genami kontrolującymi ważne cechy produkcyjne. Prezentowane w tej pracy badania molekularne zawierały markery DNA, STR i SNP, które są pomocne do określenia genetycznego charakteru cech funkcjonalnych, a także charakterystyki ras dla odmian genetycznych, zwłaszcza w rasach konserwatywnych, gdzie istnieje różnorodność genetyczna i zmienność wewnątrzgatunkowa **(I.A.17)**.

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące wcześniej rozpoczętych prac z zakresu morfologii komórek glejowych, głównie OLGs, na poziomie mikroskopu świetlnego oraz elektronowego mózgowia młodych i starzejących się osobników, w wybranych obszarach OUN u samic i samców różnych gatunków zwierząt. Zagadnienia te będą dotyczyły lepszego poznania budowy oraz topografii OLGs obszarów słabo oraz mocno mieliniзовanych u samców i samic różnych gatunków zwierząt takich jak: zwierzęta laboratoryjne (szczur, mysz, królik), zwierzęta futerkowe (lis, norka), zwierzęta gospodarskie (koń, krowa, owca, koza), ptaki, zwierzęta egzotyczne. Prace dotyczyć będą dystrybucji oraz zmienności ekspresji receptora apelinowego i swoistego białka oligodendrogleju u różnych gatunków zwierząt w różnych okresach życia osobniczego oraz ustalenia zmienności reaktywności struktur ośrodków nerwowych pod wpływem egzogennych substancji. Badania morfologiczne i morfometryczne prowadzone na poziomie mikroskopu świetlnego pozwolą lepiej zrozumieć interakcje tych komórek glejowych z innymi strukturami obecnymi w OUN. Swoją pracę naukową zamierzam poszerzyć, a do realizacji celów badawczych wykorzystam metody w oparciu o nowoczesne i zaawansowane techniki tj. metody immunofluorescencyjne, histochemiczne, morfometryczne, mikrodyssekcję oraz

immunobloting. Zastosowanie wybranych metod badawczych pozwoli na lokalizację i zawartość swoistego białka oligodendrogleju i mieliny, jako markerów w stanach prawidłowych i patologicznych struktur OUN.

### Wybrane programy szkoleniowe, dokonania organizacyjne i popularyzujące naukę

- W roku akademickim **1993/1994** pełniłam funkcję opiekuna grup studenckich
- W latach **2010-2017** przygotowywałam 11 projektów w ramach 8 edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki (LFN)
- W **2012** roku utworzyłam stronę internetową Zakładu Histologii i Embriologii: <http://histologia.eswi.pl/>, na której zamieszczono galerię barwnych obrazów tkanek i narządów jako pomocnych studentom do bieżącej nauki oraz w przygotowaniu do egzaminu z przedmiotu. Salę ćwiczeń wyposażyłam w cyfrową kamerę w celu ulepszenia i usprawnienia prowadzenia ćwiczeń. Ponadto w tym samym roku opracowałam dla studentów zeszyt do ćwiczeń z poszczególnymi tematami i kolorowymi rysunkami odzwierciedlającymi analizowane preparaty histologiczne.
- W **2014** roku odbyłam tygodniowe szkolenie w ramach *Erasmus Staff Mobility for Training* w University of Pisa, Anatomia degli Animali Domestici, Italy (Pisa /Włochy/). W ramach szkolenia realizowałam badania dotyczące metod immunohistochemicznych i immunologicznych dotyczących struktur OUN ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem hipokampa.
- Od **2015** roku jestem międzynarodowym wykładowcą w ramach programu *Erasmus Teaching Staff Mobility* i w związku z powyższym prowadziłam wykłady w j. angielskim w zagranicznych Uniwersytetach (Portugalia, Turcja).
- W **2016** roku odbyłam tygodniowe szkolenie w ramach *Erasmus Staff Mobility for Training* w Uludag University/ BURSA/Turcja. W ramach szkolenia realizowałam badania dotyczące metod infuzji hormonów dokomorowo mózgowego (I.C.V.) u szczurów. Nauczyłam się metod iniekcji hormonów do szlaku jądra pasma samotnego (*nucleus tractus solitarii vel nucleus solitarius*), dogłównie brzusznej części rdzenia przedłużonego (*rostral ventral lateral medulla /RVLM/*) oraz podwzgórza. Wykonałam pilotażowe badania wpływu I.C.V. apelinu na funkcję układu pokarmowego (GIT).
- W roku **2016** wykonałam recenzje dla czasopism naukowych: w czasopismach wyróżnionych w *Journal Citation Reports (JCR)* (część A).

- W 2017 roku odbyłam tygodniowe szkolenie w ramach *Erasmus Staff Mobility for Training* w Universidad de Santiago de Compostela, Centre for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS)/SANTIAGO DE COMPOSTELA/ Hiszpania. W ramach szkolenia zapoznałam się z najnowszymi metodami badań dotyczącymi infuzji hormonów do jądra brzuszno-przyśrodkowego (*ventromedial hypothalamic nucleus*) (VMH) oraz jądra łukowatego podwzgórza (*arcuate nucleus of the hypothalamus*) u myszy i szczurów.
- W 2017 roku odbyłam tygodniowe szkolenie w ramach *Erasmus Staff Mobility for Training* w Lithuanian University of Health Sciences /KOWNO/ Litwa. W ramach szkolenia realizowałam badania dotyczące parametrów mikrobiologicznych zawartości jelita ślepego u szczurów Wistar oraz zapoznałam się z metodami liczenia tlenowych i beztlenowych bakterii, *Lactobacillus spp.* i *enterococci* w jelicie ślepym u szczurów.

## 6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Mój łączny dorobek naukowy stanowi 97 pozycji, w tym:

- 28 oryginalnych prac twórczych
  - 27 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 5 publikacji przeglądowych
  - 2 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 5 komunikatów naukowych na konferencjach międzynarodowych
  - 5 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 48 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych
  - 47 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 11 komunikatów naukowych na konferencje krajowe o charakterze międzynarodowym
  - 11 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

**6.1. BIBLIOMETRYCZNE PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

- Suma punktów za publikacje, według załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (wg roku opublikowania)\*/według załącznika do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 09 grudnia 2016 roku\*\* wynosi odpowiednio: 424\*/ 482\*\* (odpowiednio 401 /428 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- Sumaryczny impact factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: 9,928 (9,928 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- Liczba prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez Journal Citation Reports (JCR) wynosi 18 (łącznie 335 punktów\*/335 punktów\*\*, co stanowi odpowiednio 79,01% / 69,50% ogólnej liczby punktów),
- Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science (na dzień 14.11.2017) wynosi: 2
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (Cited Reference Search - na dzień 14.11.2017) wynosi: 12



**6.2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego**

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW*	Punkty MNiSW**	IF***
<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>				
<i>Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</i>	-	-	-	-
<i>Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</i>	5	23	54	-
<i>Rozdziały w monografiach</i>	-	-	-	-
<b>Łącznie publikacje</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>54</b>	-
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>				
<i>Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</i>	18	335	305	9,928
<i>Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</i>	11	89	123	-
<i>Rozdziały w monografiach W tym stanowiące szczególne osiągnięcie</i>	1	-	-	-
<b>Łącznie publikacje</b>	<b>30</b>	<b>424</b>	<b>428</b>	<b>9,928</b>
<b>Komunikaty naukowe</b>				
<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	<b>1</b>	-	-	-
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>	<b>63</b>	-	-	-
<b>Łącznie komunikaty naukowe</b>	<b>64</b>	-	-	-
<b>Publikacje niepunktowane</b>				
<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	<b>1</b>	-	-	-
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>	<b>3</b>	-	-	-
<b>RAZEM</b> (oryginalne prace twórcze, komunikaty naukowe, publikacje niepunktowane)	<b>97</b>	<b>424</b>	<b>482</b>	<b>9,928</b>

\* wg załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (wg roku opublikowania).

\*\* wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 09 grudnia 2016 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach

\*\*\* zgodnie z rokiem wydania

## 6.3. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Czasopismo	Punkty MNiSW*	Punkty MNiSW**	Liczba prac		Suma punktów*	Suma punktów**
			Przed doktoratem	Po doktoracie		
<b>Czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>						
Medycyna Weterynaryjna	10/15	15	–	9	130	135
Folia Biologica	20	20	–	1	20	20
Bull. Vet. Inst. Pulawy	20	15	–	1	20	15
Annals of Animal Science	15	15	–	1	15	15
Brazilian Journal of Poultry Science	20	20	–	2	40	40
The Journal of Applied Poultry Research	25	25	–	1	25	25
Poultry Science	35	35	–	1	35	35
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift	20	20	–	1	20	20
Journal of Fish Diseases	30	30	–	1	30	30
<b>Publikacje naukowe w czasopismach wymienionych w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW</b>						
Medycyna Weterynaryjna	7/10/15	15	3	3	61	90
Postepy Biol. Kom	0	5	1	–	0	5
Ann. UMCS, Sect. DD	4/4/2	4	1	2	10	12
Arch Physiother Glob Res	–	–	–	2	0	0
Ortop. Traumatol. Rehabil	5	15	–	1	5	15
<b>Czasopisma naukowe nieujęte w wykazie czasopism naukowych MNiSW</b>						
Folia Morphologica	5	15	–	1	5	15
Journal of Pre-Clinical and Clinical Research	8	10	–	1	8	10
Komunikaty naukowe na konferencje międzynarodowe	–	–	–	5	–	–
Komunikaty naukowe na konferencje krajowe	–	–	–	59	–	–
<b>RAZEM</b>			<b>5</b>	<b>92</b>	<b>424</b>	<b>482</b>

\* wg załączników do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (wg roku opublikowania).

\*\* wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 09 grudnia 2016 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach; \*\*\* zgodnie z rokiem wydania

Agata Wawrzyniak