

Streszczenie

W organizmie ssaków, substancje biologicznie aktywne takie jak hormony, enzymy, probiotyki, prebiotyki czy neuropeptydy odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu większości narządów. Neuropeptydy zbudowane ze stosunkowo krótkich łańcuchów aminokwasowych są głównie syntetyzowane w komórkach nerwowych i działając jako neuromodulatory, neurotransmitery czy neurohormony odpowiadają za utrzymanie fizjologicznej homeostazy. Jednym z najlepiej poznanych i stosunkowo często badanych neuropeptydów jest galanina. Galanina jest 29/30-aminokwasowym peptydem posiadającym szerokie spectrum biologicznej aktywności. W działaniu biologicznym galaniny pośredniczą trzy różne receptory, receptor galaniny 1, receptor galaniny 2 oraz receptor galaniny 3, które wykorzystują odmienne szlaki sygnałowe. Na poziomie centralnym, galanina pośredniczy w procesach pobierania pokarmu, nocycepeji, zapamiętywania jak i ko-transmisji. Obecność galaniny stwierdzano także w układzie nerwowym jelitowym (ENS) żołądka, jelita cienkiego i jelita grubego. Chociaż obecność w ENS neuronów galanin-ergicznych oraz ich kod chemiczny był badany u człowieka, zwierząt domowych oraz zwierząt laboratoryjnych to profil biochemiczny neuronów ENS zwierząt dziko żyjących jest ciągle nie zbadany. Dlatego też celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wykazanie przy zastosowaniu techniki immunohistochemicznej obecności i zakresu występowania galaniny w neuronach i włóknach nerwowych zaopatrujących poszczególne odcinki jelita cienkiego (dwunastnica, jelito czcze, jelito biodrowe) dzika. W neuronach i włóknach nerwowych ENS jelita cienkiego dzika badano również, przy zastosowaniu techniki podwójnych barwień immunohistochemicznych, współwystępowanie galaniny z: wazoaktywnym polipeptydem jelitowym (VIP), substancją P (SP), neuropeptydem Y (NPY), syntetazą tlenu azotu (NOS), czynnikiem uwalniającym kortykotropinę (CRF), kalbindyną, serotoniną oraz peptydem kodowanym genem kalcytoniny (CGRP).

W zależności od odcinka jelita cienkiego, obecność galaniny wykazano w 5-10% neuronów warstwy mięśniowej oraz 45-65% neuronów podśluzowych. We wszystkich trzech odcinkach jelita cienkiego dzika, umiarkowanie liczne/liczne galanino-immunoreaktywne (IR) włókna nerwowe stwierdzono pomiędzy neuronami zwojów warstwy mięśniowej, zwojów podśluzowych, w warstwie mięśni okrężnych oraz pomiędzy gruczołami oraz w kosmkach błony śluzowej. Warstwa mięśni podłużnych jelita czczego oraz jelita biodrowego (ale nie dwunastnicy) zawierała pojedyncze galanino-IR włókna nerwowe. Obecność pojedynczych włókien nerwowych zawierających galaninę stwierdzono także w sąsiedztwie gruczołów Brunnera dwunastnicy, naczyń krwionośnych warstwy podśluzowej jelita czczego jak i warstwie mięśniowej błony śluzowej wszystkich trzech odcinków jelita cienkiego dzika. W galanino-IR neuronach warstwy mięśniowej dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita biodrowego, nie stwierdzono ko-lokalizacji z SP, VIP, NOS, NPY, kalbindyną, serotoniną, CRF i CGRP. Ko-lokalizację galaniny z SP, VIP oraz kalbindyną (ale nie z NOS, NPY, serotoniną, CRF i CGRP) stwierdzono w różnych subpopulacjach neuronów podśluzowych poszczególnych segmentów jelita cienkiego dzika. W poszczególnych częściach histologicznych dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita biodrowego umiarkowane do licznych ilości galanino-IR włókien nerwowych jednocześnie zawierały SP oraz VIP. Ekspresji NPY, NOS, kalbindyny, serotoniny ani CGRP nie wykryto w żadnym z galanino-IR włókien nerwowych unerwiających jelito cienkie dzika. W dwunastnicy i jelicie czczym (ale nie jelicie biodrowym) pojedyncze włókna nerwowe galanino-IR zawierały dodatkowo CRF.

Rola(e) galanino-IR neuronów/włókien nerwowych oraz potencjalne znacznie współwystępowania związków biologicznie aktywnych w galanino-IR neuronach/włóknach nerwowych, dla prawidłowego funkcjonowania oraz zaburzeń czynności jelita cienkiego dzika zostały przedyskutowane.

Summary

In mammalian body, biologically active substances, including hormones, enzymes, probiotics, prebiotics and neuropeptides play crucial roles in proper functioning of many organs. Neuropeptides built of relatively short aminoacids chains, are produced predominantly in nervous cells and maintain physiological homeostasis by acting as neuromodulators, neurotransmitters and/or neurohormones. One of the most frequently studied and well known neuropeptide is galanin. Galanin is a 29/30-aminoacid peptide with wide array of biological activities. Galanin exerts its functions via three distinct G-protein-coupled receptors, galanin receptor 1, galanin receptor 2 and galanin receptor 3, which activate different intracellular signaling pathways. At central level, galanin mediates feeding behavior, nociception, learning and co-transmission. The presence of galanin has been also found in enteric nervous system (ENS) of the stomach, small intestine and large intestine. Although in ENS of human, domestic animals and laboratory animals, the presence of galanin-ergic neurons and their chemical coding have been studied the occurrence and biochemical profile of galanin-ergic neurons in ENS of wild life animals is still obscure. The aim of the present Ph.D. thesis was to evaluate using immunohistochemical methods whether and to what extend galanin is expressed in enteric neurons and nerve fibres supplying distinct regions of the wild boar small intestine (duodenum, jejunum, ileum). Double immunohistochemical staining were applied in order to study the co-localization of galanin with vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P (SP), neuroepitide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), corticotrophin releasing factor (CRF), calbindin, serotonin and calcitonin gene-related peptide in enteric neurons and nerve fibres innervating the wild boar small intestine.

Dependently on the region of the wild boar small intestine, the expression of galanin was found in 5-10% of myenteric neurons and in 45-65% of submucous neurons. In all three segments of the small intestine, moderately numerous/numerous galanin-immunoreactive (IR)

nerve fibres were found between neurons of myenteric and submucous ganglia, smooth muscle circular layer and between gland and villi of mucosa. In longitudinal smooth muscle layer of the jejunum and ileum (but not duodenum) the presence of single galanin-IR nerve fibres were found. The presence of single galanin-expressing nerve fibres were localized around duodenal Brunner's glands, blood vessels of the jejunal submucous layer as well as in lamina muscularis mucosae of all regions of the wild boar small intestine. In galanin-IR myenteric neurons of the wild boar duodenum, jejunum and ileum no co-localizations with SP, VIP, NOS, NPY, calbindin, serotonin, CRF and CGRP were found. In all segments of the wild boar small intestine, co-localization of galanin with SP, VIP and calbindin (but not NOS, NPY, serotonin, CRF and CGRP) were found in different subpopulations of submucous neurons. In particular histological regions of the duodenum, jejunum and ileum, moderate to numerous amounts of galanin-IR nerve fibres showed co-expression with SP and VIP. Expression of NPY, NOS, calbindin, serotonin and CGRP has not been detected in any of the wild boar small intestine-supplying galanin-IR nerve fibres. In the duodenum and jejunum (but not ileum) single galanin-IR nerve fibres additionally co-stored CRF.

Role(s) of galanin-IR enteric neurons/nerve fibres and potential significance of the co-localization of biologically active substances with galanin in neurons/nerve fibres, for proper functioning and disorders of the wild boar small intestine have been discussed.