Załącznik 3a

Dr n. med. Anna Stasiak

Zakład Biochemii Hormonów
Wydział Wojskowo-Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

AUTOREFERAT

Łódź 2019

Spis treści

1. Dane personalne 2

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe 2

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych 2

4. Osiągnięcie naukowe zgodne z art. 16 ust. 2 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1785) 3

   4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego 3

   4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe 3

   4.3. Cel i uzyskane rezultaty prac stanowiących osiągnięcie naukowe 5

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze 31

   5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora 31

      5.1.1. Praca magisterska 31

      5.1.2. Rozprawa doktorska 33

   5.2. Główne prace badawcze po uzyskaniu stopnia doktora 35

      5.2.1. Rola histaminy w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u szczurów 36

      5.2.2. Rola histaminy w funkcji gruczołu sutkowego 38

      5.2.3. Ocena układu opioidowego u szczurów z preferencją alkoholową wywołaną dysfunkcją wątroby (kontynuacja badań) 39

      5.2.4. Mechanizmy regulacji wzmożonej konsumpcji paszy u szczurów z zespoleniem wrotno-czczym 40

      5.2.5. Wpływ supresji sygnalizacji histaminowej na przebieg zapalenia mięśnia sercowego 42

      5.2.6. Ośrodkowe działanie nowych nieimidazolowych ligandów receptora histaminowego H_3 46

6. Syntetyczne omówienie osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych i w zakresie popularyzacji nauki 49

1. **Dane personalne**

Imię i nazwisko: Anna Stasiak

Miejsce pracy: Uniwersytet Medyczny w Łodzi
al. Kościuszki 4, 90-419 Łódź

2. **Posiadane dyplomy i stopnie naukowe**

1999 **Dr n. med. w zakresie biologii medycznej**
Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział Lekarski;
temat rozprawy doktorskiej: *Uszkodzenie wątroby a wzmożona preferencja alkoholu u szczura. Poszukiwanie mechanizmów leżących u jej podstaw.*
Promotor: prof. dr hab. W. Agnieszka Fogel

1994 **Magister biologii;** specjalność: fizjologia (neurofizjologia);
Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
temat pracy magisterskiej: *Rola jądra pośrodkoweg szwu w regulacji zachowania emocjonalno-obronnego kota.*
Promotor: prof. dr hab. Andrzej Romaniuk

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

01.10.2016 - Starszy wykładowca
Zakład Biochemii Hormonów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź

02.10.2006 - 30.09.2016 Adiunkt
Zakład Biochemii Hormonów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź

2003 - 2012 Starszy wykładowca
Wyższa Szkoła Turystyki i Hotelarstwa w Łodzi,
ul. Senatorska 11, 90-392 Łódź

1994 - 2002 Asystent / starszy asystent
Zakład Amin Biogennych, Polska Akademia Nauk,
ul. Tylna 3, 90-364 Łódź

1989 - 1994 Studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki;
kierunek: biologia

4. Osiągnięcie naukowe zgodne 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. 2017 r. poz. 1785):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Mózgowe układy aminergiczne jako cel nowych strategii terapeutycznych chorób neurodegeneracyjnych – badania eksperymentalne *in vivo*".

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

P1. Stasiak A, Mussur M, Unzeta M, Lazewska D, Kiec-Kononowicz K, Fogel WA. The central histamine level in rat model of vascular dementia. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 549-558.
IF: 2,267; punktacja MNiSW: 25

Mój wkład w powstanie pracy: koncepcja badawcza; przeprowadzenie badań behawioralnych (Holeboard tests); pomoc przy wykonaniu operacji chirurgicznych (obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych, bilateral common carotid arteries' occlusion, BCCAO); iniekcje związków; przygotowanie materiału tkankowego do badań ex vivo; analizy biochemiczne; opracowanie i interpretacja wyników; napisanie, zredagowanie manuskryptu; autor korespondencyjny pracy.
Udział procentowy szacuję na 80%.

P2. Stasiak A, Mussur M, Unzeta M, Samadi A, Marco-Contelles J, Fogel WA. Effects of novel monoamine oxidases and cholinesterases targeting compounds on brain neurotransmitters and behavior in rat model of vascular dementia. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 161-171.
IF: 3,452; punktacja MNiSW: 35

Mój wkład w powstanie pracy: koncepcja badawcza; przeprowadzenie badań behawioralnych (Holeboard tests); pomoc przy wykonaniu operacji chirurgicznych (obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych, bilateral common carotid arteries' occlusion, BCCAO); iniekcje związków; przygotowanie materiału tkankowego do badań ex vivo; wykonanie części analiz biochemicznych; opracowanie i interpretacja wyników; napisanie i zredagowanie manuskryptu; autor korespondencyjny pracy.
Udział procentowy szacuję na 70%.

P3. Hagenow S, **Stasiak A**, Ramsay RR, Stark H. Ciproxifan, a histamine H3 receptor antagonist, reversibly inhibits monoamine oxidase A and B. *Sci Rep* 2017; 7:40541. DOI: 10.1038/srep40541.

IF: 4,122; punktacja MNiSW: 40

Mój wkład w powstanie pracy: zbadanie wpływu ciproxifanu na aktywność oksydaz monoaminowych A i B w mózgu szczura – koncepcja badań; pozyskanie i przygotowanie materiału tkankowego do badań ex vivo; radiometryczne badania kinetyki enzymów; ustalenie wartości IC_{50} dla ciproxifanu wobec MAO w mózgu szczura; opracowanie, interpretacja, opis ww. metod i wyników.
Udział procentowy szacuję na 20%.

P4. Fogel WA, **Stasiak A**, Maksymowicz M, Kobos J, Unzeta M, Mussur M. Hepatocyte transplants improve liver function and encephalopathy in portacaval shunted rats. *CNS Neurosci Ther* 2014; 20: 685-691.

IF: 3,931; punktacja MNiSW: 35

Mój wkład w powstanie pracy: współautor koncepcji badawczej; ocena preferencji alkoholowej u szczurów (testy wyboru); monitorowanie funkcji wątroby; pomoc przy wykonaniu operacji chirurgicznych (portacaval shunt); pozyskanie i przygotowanie materiału tkankowego do badań ex vivo; udział w analizach biochemicznych; opracowanie i interpretacja wyników; udział w pisaniu pracy, ostateczna redakcja manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 55%.

W *Załączniku 6.* przedstawione zostały oświadczenia wszystkich współautorów ww. prac, określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie.

Wskaźniki dokonań naukowych są zgodne z rokiem opublikowania; podano je na podstawie analizy bibliometrycznej dokonanej przez pracowników Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (*Załącznik 7*; dane z dn. 1 kwietnia 2019 r.).

Sumaryczny *Impact Factor* wyżej wymienionych publikacji: **13,772**
Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **135**

Wymienione powyżej prace, stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego, w opisie zawartym w rozdziale 4.3. cytowane są zgodnie z nadaną im numeracją [**P1, P2, P3, P4**].

Pozostałe wykorzystane źródła podawane są zgodnie z *Harvard Referencing System*; pełny wykaz piśmiennictwa zamieszczony jest na końcu rozdziału.

4.3. Cel i uzyskane rezultaty prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Układy aminergiczne wraz z układem cholinergicznym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) zaangażowane są faktycznie w generowanie wszystkich funkcji. Zmiany neurochemiczne /modyfikacje w ich obrębie/ obserwowane są w przebiegu większości chorób o podłożu neurologicznym i neuropsychiatrycznym. Patogeneza tych schorzeń związana jest zwykle z zaburzeniami złożonymi dotyczącymi kilku układów neurotransmisyjnych na raz. Wprowadzenie skutecznej terapii wymaga dogłębnego poznania mechanizmów neuronalnych i - zgodnie z najnowszą ideą - stosowania narzędzi terapeutycznych działających jednocześnie na różne systemy.

Celem badań było poszerzenie wiedzy na temat udziału mózgowych układów aminergicznych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych: demencji naczyniowej i encefalopatii wątrobowej, ze szczególną koncentracją na układzie histaminowym. Prace miały charakter eksperymentalny: wykorzystano 2 modele zwierzęce, odpowiadające ww. patologiom u człowieka:

- model demencji naczyniowej – przewlekłe niedokrwienie mózgu u szczura, wywołane poprzez obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych (*bilateral common carotid arteries' occlusion*, BCCAO),
- model encefalopatii wątrobowej – zespolenie wrotno-czcze u szczura (*portacaval shunt*, PCS; *portacaval anastomosis*).

Udział mózgowych układów aminergicznych w patogenezie demencji naczyniowej

W wielu krajach jako zagadnienie priorytetowe stawia się obecnie zwiększenie efektywności terapii chorób neurodegeneracyjnych i bakteryjnych. W populacji ludzi powyżej 65. roku życia, osoby z demencją stanowią 6-10%, przy czym 2/3 spośród nich to osoby cierpiące na chorobę Alzheimera (AD, *Alzheimer disease*)), a 1/5 – to osoby z demencją naczyniową (VD, *vascular dementia*) [Sloane i wsp., 2002; Hebert i wsp., 2003, 2013; raport *Alzheimer's Association* 2015]. Dla przykładu, w 2000 r. w USA zarejestrowanych było 4,5 mln osób z AD. Zgodnie z przewidywaniami epidemiologów do 2050 r. liczba ta wzrośnie

ponad 3-krotnie (do 13,8 mln). Podobne prognozy dotyczą VD [Gorelick i wsp., 2011; Hebert i wsp., 2013]. Oznacza to, że pilnie potrzebne są nowe strategie prewencji i terapii chorób neurodegeneracyjnych. Ich skuteczność będzie tym wyższa, im głębsza będzie wiedza o mechanizmach warunkujących te choroby i o zaburzeniach, będących skutkiem ich rozwoju.

Do tej pory mechanizmy chorób neurodegeneracyjnych: choroby Alzheimera, demencji naczyniowej i choroby Parkinsona nie zostały w pełni wyjaśnione [Diaz i Waters, 2009; Reitz i wsp., 2011]. Wiadomo jednakże, że ww. neuropatologie powiązane są z progresywną utratą neuronów w określonych obszarach mózgu i że ich etiopatogeneza obejmuje pewne wspólne zaburzenia. Zwraca się uwagę na udział stresu oksydacyjnego, cytotoksyczność reaktywnych form tlenu, zaburzenie czynności mitochondriów i apoptozę [Perez i Unzeta, 2003; Ishunina i wsp., 2004; Reynolds i wsp., 2007; Gallagher i Schapira, 2009; Facecchia i wsp., 2011; Unzeta i wsp., 2016].

Strategie terapeutyczne chorób neurodegeneracyjnych oparte są głównie na farmakologicznej modyfikacji funkcji ośrodkowych układów neurotransmisyjnych i mają charakter objawowy. Stosowane leki działają przede wszystkim na enzymy biorące udział w metabolizmie amin biogennych w mózgu, przede wszystkim na acetylocholinesterazę (AChE, *acetylcholinesterase*; EC 1.1.1.7) i oksydazę monoaminową (MAO, *monoamine oxidase*; EC 1.4.3.4). AChE odpowiada za hydrolizę acetylocholiny w obrębie synaps cholinergicznych, hamując działanie neuromediatora [Scarpini i wsp., 2003; Musiał i wsp., 2007; Youdim i wsp., 2006; Riederer i Laux, 2011; Unzeta i wsp., 2016]. Oksydaza monoaminowa (MAO, *monoamine oxidase*; EC 1.4.3.4), zlokalizowana w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, katalizuje oksydatywną deaminację różnych monoamin, zarówno endo-, jak i egzogennych. Enzym występuje w 2 formach: MAO A i MAO B, różniących się specyficznością substratową i wrażliwością na działanie inhibitorów; białka enzymów kodowane są przez 2 różne geny. MAO A odpowiada głównie za deaminację serotoniny (5-HT) i jest wrażliwa na klorgilinę. MAO B zaś wykazuje największe powinowactwo do β-fenyloetyloaminy i benzyloaminy; jest hamowana przez deprenyl i pargilinę. Dopamina (DA), noradrenalina (NA), adrenalina, tryptamina i tyramina mogą być oksydacyjnie deaminowane przez obie formy enzymu [Weyler i wsp., 1990; Shih i wsp., 1998; Youdim i wsp., 2006].

Demencja naczyniowa definiowana jest jako postępująca choroba neurodegeneracyjna, prowadząca do zaburzeń kognitywnych (poznawczych, otępienia) i motorycznych, które można przypisać patologiom naczyniowym prowadzącym

do zmniejszenia przepływu krwi przez mózg (hipoperfuzji); określana jest także jako demencja skrzepowa albo demencja warunkowana zaburzeniem krwioobiegu [Du i wsp., 2016]. Mózg jest bardzo wrażliwy na niedotlenienie. W warunkach fizjologicznych wykorzystuje 20% podaży tlenu w organizmie. Zgodnie z danymi statystycznymi, udar mózgu jest jedną z trzech najczęstszych przyczyn śmierci na świecie – dotyka przede wszystkim ludzi w starszym wieku. Stany zapalne i stres oksydacyjny, nasilające się wraz z wiekiem, negatywnie wpływają na stan naczyń; progresji schorzenia sprzyjają zaburzenia pracy układu immunologicznego [DiNapoli i wsp., 2008; Iadecola i Anrather, 2011]. W Polsce na udar mózgu choruje 70 tys. osób rocznie, z czego jedna trzecia umiera. 80-85% przypadków to udary niedokrwienne, pozostałe – krwotoki do mózgu.

VD jest drugą pod względem rozpowszechnienia formą demencji. Często występuje mieszana postać choroby – koegzystencja VD i AD [Marchant i wsp., 2013; Chui i Ramirez-Gomez, 2015]. Dla przykładu, w Danii u ok. 8 000 osób zdiagnozowano demencję naczyniową, a prawdopodobnie dalsze 15 000 osób cierpi na kombinację VD i AD. Symptomy choroby są uzależnione od tego, które części mózgu zostały objęte zmianami patologicznymi. Chorzy mogą mieć problemy z pamięcią i koncentracją, zmiany w emocjach (depresyjność, smutek), paraliż lub osłabienie jednej strony ciała [Venkat i wsp., 2015]. Przebieg choroby może być bardzo różny. Przy zakrzepach lub wylewach krwi do mózgu symptomy występują nagle i niespodziewanie. Jeżeli występuje więcej wylewów albo skrzepów przez dłuższy okres czasu, objawy rozwijają się stopniowo. Inne przyczyny demencji naczyniowej to krwotoki lub choroby głębokich naczyń krwionośnych mózgu. Rozwojowi VD sprzyja wiek, płeć (częściej dotyka mężczyzn) i szereg różnych chorób, w tym nadciśnienie i zespół metaboliczny. Do wysokich czynników ryzyka należy także nadużywanie alkoholu i palenie papierosów [Bowler, 2005; Raffaitin i wsp., 2009; Sharp i wsp., 2011; Peters, 2012].

W patogenezie VD zwraca się uwagę na udział stresu oksydacyjnego [Chen i wsp., 2011; Luca i wsp., 2015], procesy zapalne szerzące się w OUN (rolę cytokin i chemokin prozapalnych: IL-1β, IL-6, TNF-α) [Rosenberg i wsp., 2014; Heppner i wsp., 2015; Fakhoury, 2015], dysfunkcję i agregację mitochondriów [He i wsp., 2009; Jian i wsp., 2013; Du i wsp., 2013], zakłócenie metabolizmu lipidów w mózgu [Toyran i wsp., 2004; Adibhatla i wsp., 2003; Bhattacharjee i wsp., 2012] i zmiany poziomu czynników wzrostu kluczowych dla proliferacji i różnicowania komórek; w przewlekłych postaciach VD zaś m.in. na obniżenie ekspresji (*down-regulation*) neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) [Larsson i wsp., 1999; Kermani i wsp., 2007].

Badania wskazują także na zaburzenia w różnych układach neurotransmisyjnych, prowadzące do deficytu acetylocholiny, dopaminy, kwasu γ-aminomasłowego (GABA), glutaminianu i zmian w układzie histaminowym [Yatomi i wsp., 2013; Xi i wsp., 2014; Li i wsp., 2014; **P1; P2**]. Przewlekła hipoperfuzja mózgu prowadzi do trwałych zaburzeń kognitywnych, charakterystycznych zarówno dla VD, jak i AD [Venkat i wsp., 2015].

Obecnie u wysokiego odsetek osób, które przeszły udar, rozwija się w przyszłości AD. Jest to dowodem na ścisłe powiązania między tymi dwoma jednostkami chorobowymi. Niedotlenienie i niedokrwienne mózgu wywołuje wzrost aktywności (*up-regulation*) β-sekretazy (BACE1, *beta-site amyloid prekursor protein – cleaving enzyme 1*). Podwyższony poziom stężenia i aktywności BACE1 intensyfikuje procesy amyloidogenezy, czego skutkiem jest zwiększenie zawartości β-amyloidu [Guglielmotto i wsp., 2009]. Liczne badania dowodzą, że zmiany naczyniowe odgrywają ważną rolę w powstawaniu i progresji zaburzeń neurologicznych, również w przebiegu AD [Zlokovic, 2008; Grammas, 2011; Marchesi, 2014].

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną związaną z wiekiem. Charakteryzuje się postępującą utratą neuronów cholinergicznych. Zmiany zlokalizowane są głównie w obrębie kory mózgu, hipokampa i niektórych jąder podkorowych [Talesa, 2001; Unzeta i wsp., 2016]. Deficytowi acetylocholiny towarzyszą także zaburzenia w innych układach neurotransmisyjnych: obniżenie aktywności układu serotoninergicznego i dopaminergicznego, wzrost poziomu kwasu glutaminowego [Garcia-Alloza i wsp., 2005; Terry i wsp., 2008]. Hipotezy te są także inspiracją do badań nad nowymi lekami [Trillo i wsp., 2013; Martorana i Koch, 2014; Claeysen i wsp., 2015].

Charakterystyka neuropatologiczna AD obejmuje zewnątrzkomórkowe odkładanie się złogów β-amyloidu (zawierających także inne komponenty, tworzące tzw. płytki starcze, *senile plaques*), wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne (*neurofibrillar tangles*) tworzone przez nadmiernie ufosforylowane białko *tau* (jedno z białek związanych z mikrotubulami), cechy morfologiczne apoptozy, odpowiedzi zapalnej i uszkodzeń oksydacyjnych w neuronach [Selkoe, 2001]. Dotychczas nie wiadomo, czy patologiczne białka są przyczyną choroby, czy też ich deponowanie ma charakter wtórny, tj. powstają przy okazji innych zaburzeń stanowiących pierwotną przyczynę choroby.

Zmiany neurochemiczne i morfologiczne prowadzą do stopniowej utraty pamięci i zdolności poznawczych, trudności w komunikacji (zaburzenia mowy) i innych dysfunkcji behawioralnych [Musiał i wsp., 2007; Reitz i wsp., 2011]. Terapia AD ma charakter objawowy, aczkolwiek stosowane leki korzystnie modyfikują przebieg choroby. Leczenie

podstawowe oparte jest na hipotezie cholinergicznej rozwoju AD – ma na celu wzmocnienie transmisji cholinergicznej poprzez hamowanie degradacji ACh. Stosuje się różne inhibitory AChE (takryna, donepezil, rivastigmine, physostigmine). Terapia korzystnie modyfikuje przebieg choroby: ma pozytywny wpływ na zdolności umysłowe i funkcjonalne osób dotkniętych AD. Blokery AChE hamują także aktywność butyrylocholinesterazy (EC 3.1.1.8), enzymu który także degraduje estry cholinowe, w tym ACh [Unzeta i wsp., 2016]. Ponadto wykazano, że takryna hamuje *N*-metylotransferazę histaminową (HMT, N-methyltransferase; EC 2.1.1.8), główny enzym metabolizujący histaminę (HA) w mózgu [Cumming i Vincent, 1992; Morisset i wsp., 1996; Musiał i wsp., 2007; **P2**].

Układ histaminowy odgrywa ważną rolę w procesach kognitywnych. Zaburzenia w mózgowym poziomie aminy mogą być jednym z czynników warunkujących choroby neurodegeneracyjne [Passani i Blandina, 2011; Baronio i wsp., 2014; **P1**].

W badaniach przedklinicznych i klinicznych oceniana jest skuteczność nowych strategii terapeutycznych opartych nie tylko na podnoszeniu mózgowego poziomu ACh (inhibitory AChE) i niwelowaniu agregacji złogów β-amyloidu [Dias i Viegas, 2014; Tonelli i wsp., 2015]. Testuje się mi.in. związki wpływające na aktywność MAO, receptory 5-HT_3 i NMDA oraz napięciowo-zależne kanały wapniowe [León i Marco-Contelles, 2011; Fakhfouri i wsp., 2012; Simoni i wsp., 2012; Ismaili i wsp., 2016; Unzeta i wsp., 2016]. Farmakoterapia AD obejmuje już stosowanie memantyny – antagonisty receptora NMDA [Doody i wsp., 2007]. Lek obniża zbyt duże stężenie kwasu glutaminowego (blokuje objawy patologiczne będące skutkiem zwiększonego stężenia glutaminianu).

Post mortem, w obszarach mózgu objętych zmianami neurodegeneracyjnymi, którym towarzyszy astroglioza, odnotowano zwiększoną aktywność MAO B [Saura i wsp., 1994]. Sugeruje to możliwą skuteczność inhibitorów enzymu w terapii AD. Wykazano także powiązanie między AD a depresją. Inhibitory MAO mogą także łagodzić objawy depresji, i tym samym niwelować czynnik sprzyjający progresji choroby [Caraci i wsp., 2010].

Choroba Parkinsona (PD) powiązana jest z obumieraniem neuronów dopaminergicznych w substancji czarnej i prążkowiu. Charakteryzuje się zaburzeniami ruchowymi, poznawczymi i psychiatrycznymi, przy czym dwie ostatnie dysfunkcje nie dotyczą wszystkich chorych. Do najbardziej charakterystycznych zaburzeń ruchowych należą: bradykinezja, sztywność mięśniowa, drżenie spoczynkowe oraz zaburzenia stabilności postawy. Wśród objawów pozaruchowych PD wyróżnia się: zaburzenia układu wegetatywnego, zaburzenia snu, depresję, apatię, lęk oraz zaburzenia funkcji poznawczych (w tym otępienie) [Sanz i wsp., 2004; Hermanowicz, 2007; Diaz i Waters, 2009].

Terapia PD oparta jest głównie na podnoszeniu mózgowego poziomu DA poprzez obwodowe stosowanie prekursora aminy, L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA) wraz z inhibitorami obwodowej dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych (benserazyd), co uniemożliwia przekształcenie prekursora w dopaminę we krwi obwodowej i w efekcie pozwala na zmniejszenie o ok. 70% doustnej, terapeutycznej dawki lewodopy. Inhibitory te nie przechodzą przez barierę krew-mózg, natomiast L-DOPA tak: w mózgu w neuronach dopaminergicznych przekształcana jest w dopaminę [Hermanowicz, 2007; Rezak, 2007; Diaz i Waters, 2009]. Niestety, L-DOPA nie zapobiega obumieraniu komórek produkujących dopaminę. W większości przypadków organizm pacjentów reaguje pozytywnie na lek jedynie przez kilka pierwszych lat; po pewnym czasie, gdy spadnie ilość neuronów przekształcających prekursor w dopaminę, niezbędne jest zwiększanie dawki preparatu, co prowadzi do wielu niepożądanych skutków ubocznych (m.in. fluktuacji ruchowych, dyskinez, zaostrzenia zaburzeń poznawczych i psychotycznych).

Inną strategią leczenia jest hamowanie procesu rozkładu już uwolnionej z neuronu dopaminy. Można to zrobić poprzez zahamowanie enzymów katecholo-O-metylotransferazy (COMT) lub MAO B, odpowiedzialnych za jej rozkład. Jeszcze inna z stosowanych strategii leczenia to podawanie agonistów receptorów dopaminowych – substancji naśladujących działanie dopaminy. Ich zadaniem jest pobudzanie receptorów dopaminowych zlokalizowanych na neuronach w mózgu [Knoll, 1983; Tetrud i Langston, 1989; Lieberman, 1992; Hermanowicz, 2007; Rezak, 2007; Diaz i Waters, 2009].

Chirurgiczne strategie leczenia choroby Parkinsona oparte są na wszczepianiu do mózgu komórek produkujących dopaminę, pochodzących od pacjenta lub z płodów ludzkich. Stosowanie komórek pochodzących od pacjentów jest jednakże mało skuteczne: występują one w małych ilościach i po transplantacji szybko obumierają [Lindvall, 2016].

W leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych potrzebne są nowe strategie terapeutyczne. Opracowanie ich wymaga dogłębnego poznania mechanizmów warunkujących choroby. Obecnie w tym zakresie testuje się wiele związków. Obserwacje z kliniki człowieka wskazują, że często w terapii lepiej sprawdzają się związki nieselektywne, o kilku punktach działania.

Celem badań opisanych **w pracach P1 i P2** było uzyskanie informacji na temat funkcjonowania mózgowych układów aminergicznych w warunkach demencji naczyniowej, ze szczególnym uwzględnieniem układu histaminowego, oraz odpowiedź na pytanie, jak manipulacje neurochemiczne, prowadzące do normalizacji poziomu neurotransmiterów,

poprzez blokowanie ich rozkładu lub nasilenie uwalniania, wpłyną na funkcje kognitywne. Jak już wcześniej zaznaczono, ostatnio coraz więcej jest danych, że w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych istotny udział ma przewlekłe niedokrwienie mózgu [Zlokovic, 2008; Grammas, 2011; Marchesi, 2014]. Z tego powodu badania przeprowadzono na zwierzęcym modelu niedokrwienia mózgu, indukowanym poprzez obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych (BCCAO, *bilateral common carotid artery occlusion*) [Ni i wsp., 1994; Otori i wsp., 2003; Farkas i wsp., 2007; **P1; P2**].

BCCAO wywołuje u szczura zmiany, odpowiadające niewydolności krążenia mózgowego u człowieka – zaburzenia uczenia i zapamiętywania; *post mortem* rejestruje się zmiany morfologiczne w istocie białej mózgu [Farkas i wsp., 2007]. Wiadomo, że efekty niedokrwienia, wywołane zamknięciem przepływu krwi przez tętnice szyjne wspólne, są u szczura obserwowane tylko przez kilka tygodni. Bezpośrednio po zabiegu, dochodzi do obniżenia mózgowego przepływu krwi (*cerebral blood flow*, CBF), zależnie od obszaru w granicach 33-58% CBF kontrolnego. Jednakże, już w 4. tygodniu od operacji, w wielu strukturach widoczna jest poprawa – lokalne przepływy plasują się na poziomie 52-78% CBF kontrolnego. W 8. tygodniu niektóre obszary mają jeszcze obniżone CBF o 13-29% [Otori i wsp., 2003]. Natomiast 6 miesięcy po operacji u dorosłych szczurów CBF nie różni się od kontrolnego [Choy i wsp., 2006]. Procesy adaptacyjne włączają kompensacyjne wytworzenie krążenia obocznego, głównie wywodzącego się z tętnic kręgowych, oraz zmianę średnicy tętnicy podstawnej, tętnicy mózgowej tylnej, szyjnej wewnętrznej, tętnicy mózgowej środkowej i przedniej. Ze względu na ustępujący charakter zmian, badania przeprowadzono w ciągu kilkunastu dni od zabiegu, według schematu prezentowanego na Ryc. 1.

Kolejne dni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28	33	38
Procedura eksperymentalna	*Test wstępny*				*P*	*P*	*P*	*Trening, 1 – 4 d*				*P*	*P*	*T 7d*	*BCCAO*	*Terapia farmakologiczna*						*R 1*	*R 2*	*R 3*	*R 4*

Ryc. 1. Protokół eksperymentalny **[P1]**

BCCAO – obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych (*bilateral common carotid artery occlusion*), P – przerwa, T 7d – 7. dzień fazy treningu, R1-R4 – testy ponowne (*retests*); test wstępny – faza przyzwyczajenia

Do eksperymentów zakwalifikowano tylko te zwierzęta, które pozytywnie przeszły wstępne badania behawioralne (test wstępny), mające na celu oszacowanie funkcji kognitywnych, tj. szczury szybko uczące się. Ocenę zdolności uczenia się i pamięci przeprowadzono wykorzystując test *Holeboard*, badający pamięć operacyjną (WM, *working*

memory) i przestrzenną (RM, *reference memory*) [Lannert i Hoyer, 1998; **P1; P2**]. Badania były wykonane przed zoperowaniem zwierząt i w różnych okresach pooperacyjnych (retesty R1-R4), w grupach poddawanych i niepoddawanych terapii farmakologicznej.

Aparat służący do przeprowadzenia testu *Holeboard* ma formę pudełka o powierzchni 1 m^2, z podłogą wyposażoną w 16 otworów (w układzie 4 x 4), w których umieszcza się kubeczki z ok. 50 g paszy (Ryc. 2).

	1	2	3	4
A	T			R
B		R	T	
C		T	R	
D	R			T

Ryc. 2. Obszar testowy aparatu *Holeboard* uwzględniający pozycję kubków z paszą podczas fazy treningu (T) i retestów (R) [**P1**; opracowane na podstawie *Lannert i Hoyer, 1998*].

Podczas testu wstępnego (faza przyzwyczajenia) w każdym kubeczku znajduje się pasza. Szczury motywowane głodzeniem uczą się w ciągu 4 dni szybkiego znajdowania i spożycia pokarmu (maksymalny czas: 10 min). W kolejnej fazie nauki – treningu (7 dni, z pauzą 5. i 6. dnia) pasza znajduje się tylko w 4 kubeczkach (pozycje: A1, B3, C2, D4), a czas przeznaczony na wykonanie zadania to 5 min. [Lannert i Hoyer, 1998]. Zdolność zapamiętywania oceniana jest w retestach (R1-R4), podczas których pokarm znajduje się w otworach A4, B2, C3 i D1. Rejestracja obejmuje latencję (tj. czas od momentu rozpoczęcia testu do wizyty w pierwszym dołku), liczbę wizyt i rewizyt w dołkach zawierających pokarm i pustych oraz czas potrzebny na wykonanie zadania.

Na podstawie ww. parametrów wylicza się współczynniki WM i RM (*WM, RM ratio*) i tym samym ocenia pamięć operacyjną i przestrzenną [**P1; P2**]. Do operacji BCCAO kwalifikowano szczury z WM powyżej 50% i RM powyżej 40% (aby wykluczyć wpływ innych, nieznanych czynników upośledzających pamięć).

U ramach badań opublikowanych w pracy **P1**, u szczurów Wistar, poddanym operacjom BCCAO zastosowano:

- PF9601N, *N*-(2-propynylo)-2-(5-benzyloksy-indolilo) metyloaminę – stosunkowo niedawno zsyntetyzowany inhibitor MAO B, bardziej skuteczny niż deprenyl, o udowodnionym działaniu neuroprotekcyjnym [Cutillas i wsp., 2002; Pérez i Unzeta,

2003; Pérez i wsp., 2003; Battaglia i wsp., 2006; Sanz i wsp., 2009]; dawka: 40 mg/kg,

- DL76, 1-[3-(4-tert-butylofenoksy)propylo]piperydynę – antagonistę receptorów histaminowych typu H_3, zlokalizowanych w OUN presynaptycznie na neuronach histaminergicznych (jako autoreceptory) i innych typach komórek jako heteroreceptory (na neuronach serotoninergicznych, noradrenergicznych, dopaminergicznych i cholinergicznych); występowanie H_3Rs predestynuje związki na nie oddziałujące do rozważenia stosowania ich w terapiach chorób neurodegeneracyjnych [Passani i wsp., 2004; Łazewska i wsp., 2009; Łazewska i Kiec-Kononowicz, 2010; Passani i Blandina, 2011]; dawka: 6 mg/kg,
- jako związek referencyjny – takrynę, inhibitor AChE zatwierdzony jako pierwszy do terapii AD [Unzeta i wsp., 2016]; dawka: 3 mg/kg.

Wszystkie związki były podawane dootrzewnowo przez 6 kolejnych dni.

Skutkiem podwiązania tętnic szyjnych wspólnych u szczura są zaburzenia kognitywne, odzwierciedlane przez gorsze rezultaty zwierząt uzyskiwane w teście Holeboard. Po operacji wydłużeniu ulegają parametry związane z czasem realizacji zadania, pogarsza się pamięć WM i RM.

Pierwszy retest, przeprowadzony 7. dnia od operacji, wykazał że BCCAO spowodowało u szczurów drastyczny wzrost latencji (20-60-krotny) oraz wydłużenie czasu przebywania w aparacie w zakresie 170-260%. W porównaniu z rezultatami badań behawioralnych sprzed operacji (7. dzień fazy treningu), zabieg bardziej zaburzył pamięć operacyjną (spadek o 40%) niż pamięć przestrzenną (spadek o mniej niż 20%).

Wszystkie 3 podawane związki wpłynęły pozytywnie na badane parametry pamięci. W grupie zwierząt traktowanych PF9601N i takryną, współczynnik WM i RM utrzymywał się na tym samym poziomie, co 7. dnia treningu, podczas gdy DL-76 raczej poprawiał WM, niż RM. Współczynnik WM, wyliczony na podstawie parametrów zarejestrowanych w R1, był znamiennie statystycznie wyższy w porównaniu ze zwierzętami po BCCAO, niepoddanymi terapii. W kolejnych retestach (R1-R4) wszystkie grupy zwierząt osiągnęły podobne rezultaty.

Po przeprowadzeniu 3-4. retestu (tj. 2-3 tygodnie po BCCAO) szczury zostały zdekapitowane, a tkanki zabezpieczone do badań biochemicznych. W mózgu (podzielonym na podwzgórze i „resztę mózgową") oznaczono stężenie histaminy, aktywność oksydazy

monoaminowej A i B, acetylocholinesterazy oraz *N*-metylotransferazy histaminowej (HMT), zgodnie z opisanymi metodami [**P1**].

Badania biochemiczne wykazały, że sama operacja BCCAO nie powoduje zmian w mózgowej aktywności MAO A i B. Aktywność enzymu, przede wszystkim MAO B, uległa jednakże znacznej redukcji w mózgach zwierząt, którym podawano PF9601N, pomimo zaprzestania iniekcji związku 3 tygodnie wcześniej. Związek prawie całkowicie zablokował MAO B w reszcie mózgu i ponad 2-krotnie obniżył aktywność enzymu w podwzgórzu. W przypadku MAO A, po zastosowaniu PF9601N, aktywność enzymu została zredukowana w granicach 40% w obu badanych częściach mózgu. Pozostałe związki, tj. takryna i DL 76, nie wpłynęły na aktywność MAO. W żadnej z grup nie uległa zmianie także aktywność HMT i AChE.

U zwierząt po BCCAO wykryto istotne statystycznie obniżone stężenie HA w podwzgórzu w porównaniu z kontrolą. Efekt ten był również zarejestrowany u zwierząt, którym podawano takrynę. U szczurów po BCCAO, traktowanych PF9601N i DL 76, poziom histaminy w mózgu również był niższy w odniesieniu do zwierząt zdrowych, aczkolwiek wyższy niż w grupie BCCAO i BCCAO-takryna (zmiany te nie były jednakże znamienne statystycznie).

Jak już wspomniałam, w terapii chorób neurodegeneracyjnych, mają szansę być skuteczne związki działające kompleksowo, wpływające na różne enzymy, i przez to modyfikujące funkcję różnych układów neurotransmisyjnych.

W kolejnych badaniach, opisanych **w pracy P2,** uzyskałam wgląd w mózgowe układy neurotransmisyjne u szczurów z VD poprzez zastosowanie preparatów wielofunkcyjnych, zsyntetyzowanych w oparciu o 2 związki o udokumentowanej skuteczności terapeutycznej, tj. donepezil i PF9601N [Cutillas i wsp., 2002; Pérez i Unzeta, 2003; Pérez i wsp., 2003; Battaglia i wsp., 2006; Birks i Harvey, 2006; Sanz i wsp., 2009; Unzeta i wsp., 2016]. Oceniłam także *in vivo* możliwości terapeutyczne nowo zsyntetyzowanych hybryd, które do tej pory podlegały ewaluacji tylko w warunkach *in vitro*. Schemat tych eksperymentów był analogiczny do opisanych w pracy **P1**.

Szczury z demencją naczyniową, indukowaną operacją BCCAO, miały podawane 2 takie preparaty, zsyntetyzowane przez chemików z laboratorium prof. J. L. Marco-Contellesa w Madrycie (Zał. 4, pkt III.B.4):

- ASS188: *N*-{[5-(2-(1-benzylopiperydyn-4-ylo)etoksy)-1-metylo-1*H*-indol-2-ilo]metylo}-*N*-metyloprop-2-yno-1-aminę,

- ASS234: *N*-{[5-(3-(1-benzylopiperydyn-4-ylo)propoksy)-1-metylo-1*H*-indol-2-ilo] me-tylo}-*N*-metyloprop-2-yno-1-aminę [Ismaili i wsp., 2016; Unzeta i wsp., 2016].

Syntezie nowych związków przyświecała idea, aby blokowały zarówno AChE (efekt donepezilu), jak i MAO (efekt zależny od komponenty propargiloaminowej PF9601N), i tym samym nasilały zarówno transmisję cholinergiczną, jak i monoaminergiczną oraz zachowały neuroprotekcyjne właściwości PF9601N. Sam donepezil nie jest inhibitorem MAO, a PF9601N, hamując skutecznie MAO B, nie wpływa na aktywność cholinesteraz [Bolea i wsp., 2011; **P2**].

Na początku eksperymentów ASS188 (1 mg/kg, *sc.*, 5 dni) i ASS234 (5 mg/kg, *sc.*, 5 dni) zostały zaaplikowane szczurom zdrowym (*intact*) w celu sprawdzenia, czy związki te przechodzą przez barierę krew-mózg, i czy wykazują działanie ośrodkowe W przypadku ASS188, oprócz grupy kontrolnej, do badań włączono dla porównania także szczury, którym podawano klorgilinę (0,3 mg/kg, *sc.*) i deprenyl (0,5 mg/kg, *sc.*), klasyczne inhibitory odpowiednio: MAO A i B. Podawanie ASS234 odniesione było tylko do kontroli (iniekcje 0,9% NaCl). Wstępna ewaluacja hybryd była prowadzona w badaniach *in vivo*, przy użyciu klatek metabolicznych, pozwalających sprawdzić, czy związki te wpływają na spożycie paszy i wody, i pośrednio – czy przechodzą przez barierę krew-mózg.

ASS188 i oba referencyjne inhibitory MAO nie wpłynęły na dzienną konsumpcję szczurów i ilość wydalanego moczu [**P2**]. Podawanie ASS234 spowodowało zaś znamienny statystycznie spadek spożycia paszy i wody (o ok. 30%) oraz ilości wydalanego moczu.

Badania *post mortem* wykazały, że podawanie obu związków wywołuje zmiany w mózgowych układach aminergicznych oraz aktywności enzymów MAO i HMT. W mózgach szczurów traktowanych ASS188 i ASS234 stwierdzono zwiększone, w porównaniu z kontrolą, stężenie serotoniny, dopaminy, noradrenaliny i histaminy (poziom 5-HT i HA oceniano w podwzgórzu i reszcie mózgu, DA i NA – tylko w „reszcie mózgu"). Rezultaty te mogą być konsekwencją obniżenia aktywności enzymów metabolizujących aminy. Oba badane związki okazały się efektywnymi inhibitorami oksydazy monoaminowej. ASS188, w obu badanych częściach mózgu, spowodował o ponad 95% spadek aktywności MAO A (wynik ten jest porównywalny z otrzymanym w grupie zwierząt, którym podawano klorgilinę, klasyczny inhibitor MAO A), a aktywność MAO B obniżył o 30%. ASS234 zaś całkowicie zablokował MAO A w reszcie mózgu, a w podwzgórzu odnotowano tylko 4%

aktywności fizjologicznej enzymu. W przypadku MAO B u zwierząt traktowanych ASS234 odnotowano spadek aktywności enzymu w granicach 40%.

ASS234 spowodował także w podwzgórzu obniżenie aktywności HMT. Dodatkowo, w prążkowiu szczurów wykryto niższą aktywność AChE [**P2**].

W dalszych badaniach sprawdzono efektywność działania ASS188 i ASS234 u szczurów z VD wywołaną podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych (BCCAO). Interwencja chirurgiczna, jak zazwyczaj, doprowadziła do pogorszenia parametrów pamięci (skutek niedokrwienia mózgu). Podawanie obu hybryd zniwelowało negatywny wpływ BCCAO na funkcje kognitywne. Szczury po BCCAO, którym podawano nowo zsyntetyzowane związki – hybrydy, uzyskały w teście *Holeboard* lepsze wyniki w porównaniu ze zwierzętami niepoddanymi terapii, przy czym badane związki poprawiały przede wszystkim pamięć operacyjną (WM).

W przeprowadzonych badaniach behawioralnych, oceniających funkcje kognitywne zwierząt, bardziej skuteczny okazał się związek ASS234. Wskaźnik WM u szczurów BCCAO, którym podawano ASS234, wyliczony na podstawie parametrów zarejestrowanych w teście *Holeboard* w retestach R1 i R2 (tj. 7-12 dni po wywołaniu niedokrwienia mózgu), utrzymał się na tym samym poziomie, co w 7. dniu fazy treningu (najlepszy rezultat przed operacją) [**P2**].

Pozytywny wpływ na funkcje kognitywne związków – hybryd, których budowa chemiczna oparta jest na strukturze donepezilu i PF9601N, może wynikać m.in. z normalizacji zmian neurochemicznych w mózgu spowodowanych niedokrwieniem. Wiadomo, że BCCAO zaburza mózgowe układy aminergiczne. ASS188 i ASS234 poprzez hamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za metabolizowanie amin (MAO A i B, HMT) podnoszą poziom neuroprzekaźników (5-HT, DA, NA, HA) [**P2**].

Rozważyć należy także i inne mechanizmy neuroprotekcyjne. Bolea i wsp. [2013] wykazali w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych (*human neuroblastoma cells*), że ASS234 charakteryzuje się właściwościami antyoksydacyjnymi. Dodatkowo zaobserwowano, że związek przeciwdziała także agregacji złogów β-amyloidu, co predestynuje go do testów w kierunku terapii choroby Alzheimera [Bolea i wsp., 2013; Unzeta i wsp., 2016].

Przeprowadzone przeze mnie badania w oparciu o eksperymentalny model demencji naczyniowej u szczura (BCCAO) wykazały, że w warunkach niedokrwienia mózgu zaburzona

jest funkcja układu histaminergicznego i innych układów neurotransmisyjnych. Terapie farmakologiczne działające na poziomie enzymów metabolizujących aminy wpływają korzystnie na zaburzenia neurochemiczne i kognitywne rozwijające się w przebiegu VD. Wykazałam, że na zaburzenia kognitywne u szczura z VD korzystnie działają związki wpływające na układ cholinergiczny (takryna), blokujące receptory histaminowe typu H_3 (DL 76) i hamujące aktywność MAO B (PF9601), oraz związki o charakterze wielofunkcyjnym, tj. hybrydy zsyntetyzowane w oparciu o donepezil (inhibitor AChE) i PF9601 (inhibitor MAO B), modyfikujące różne układy neuroprzekaźnikowe.

Po raz pierwszy wykazałam w badaniach *in vivo*, że nowo zsyntetyzowane hybrydy (ASS188 i ASS234) przechodzą przez barierę krew-mózg (świadczą o tym zarówno wyniki badań behawioralnych, jak i przeprowadzonych *post mortem* analiz biochemicznych). Pokazałam także, że skuteczność terapeutyczna *in vivo* ww. związków wynika z hamowania aktywności obu form oksydaz monoaminowych (MAO A i B) oraz *N*-metylotransferazy histaminowej (HMT), czego skutkiem jest normalizacja poziomu 5-HT, DA, NA i HA.

Uzyskane wyniki inspirują do dalszych badań nad wykorzystaniem hybryd w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Szczególnie obiecujący, ze względu na efektywniejsze działanie, wydaje się związek ASS234.

Perspektywy terapeutycznego wykorzystania związków dwufunkcyjnych, łączących aktywność antagonisty receptora histaminowego H_3 i inhibitora aktywności MAO

Receptor histaminowy H_3 (H_3R) to receptor metabotropowy, sprzężony z białkiem G_i/G_o, wykazujący konstytutywną aktywność (aktywność podstawowa bez wiązania agonisty), hamujący uwalnianie histaminy (jako autoreceptor) oraz innych neuroprzekaźników: DA, 5-HT, ACh (jako heteroreceptor) [przegląd: Panula *et al.*, 2015]. W konsekwencji odwrotny agonizm/antagonizm H_3R prowadzi do przyspieszonego uwalniania ww. neuroprzekaźników, dlatego odwrotni agoniści H_3R/antagoniści H_3R są uznawani za obiecujące leki w terapii chorób OUN [Passani and Blandina, 2011].

Ciproxifan (cyklopropylo 4- (3- (1H-imidazol-4-ilo) propyloksy) fenylometanon) jest dobrze scharakteryzowanym odwrotnym agonistą/antagonistą receptora H_3R. Ma wysokie powinowactwo do H_3R u gryzoni (szczur: K_i = 0,4-6,2 nM; mysz: K_i = 0,5-0,8 nM) oraz zdecydowanie mniejsze powinowactwo do H_3R u człowieka (K_i = 46-180 nM) [Ligneau *et al.*, 2000]. W badaniach *in vivo* wykazano skuteczność liganda w normalizacji cyklu sen-czuwanie i poprawie uwagi. Ciproxifan jest powszechnie stosowany jako związek

referencyjny w badaniach dotyczących roli H_3Rs w stanach fizjologicznych i patologicznych, w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem różnych eksperymentalnych modeli zwierzęcych (badania dotyczące zaburzeń kognitywnych, AD, zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi – ADHD, schizofrenii, zaburzeń snu, autyzmu).

Podczas badań przesiewowych pod kątem inhibitorów oksydaz monoaminowych A i B zaobserwowano, że ligand także hamuje aktywność obu izoform enzymów.
MAO A i B scharakteryzowano już powyżej. Jak już wspomniano, ze względu na lokalizację enzymów i ich funkcję, inhibitory MAO mają m.in. zastosowanie w leczeniu PD i depresji.

Celem badań przedstawionych w **P3** było precyzyjne określenie zdolności ciproxifanu do hamowania ludzkiego MAO A i MAO B przez określenie wartości IC_{50} i wykazanie odwracalności działania (badania *in vitro*) oraz ustalenie, w jakim zakresie ligand hamuje aktywność MAO w mózgu szczura.

Wyznaczenie IC50 – badania przeprowadzone na mózgu szczura

Badania zostały przeprowadzone na mózgach szczurów (samcach szczepu Wistar). W każdym eksperymencie użyto homogenatów przygotowanych z mózgów pochodzących od trzech zwierząt. Aktywność MAO A i MAO B mierzono stosując odpowiedni radioaktywny substrat: serotoninę (5- [2-^{14}C] - hydroxytryptamine binoxalate) lub β-fenyloetyloaminę (β-[ethyl-1-^{14}C]-phenyl-ethyl-amine hydrochloride; PEA), zgodnie z procedurą opisaną przez Fowler i Tipton [1981] z modyfikacjami wprowadzonymi przez Gómeza i wsp. [1988]. Wartości IC_{50} ustalono stosując 6 różnych stężeń ciproxifanu w zakresie od 10^{-9} M do 5×10^{-4} M, przy stałym stężeniu substratu (odpowiednio: 200 μM 5-HT lub 20 μM PEA). Wartości IC_{50} wyznaczono w 3 niezależnych eksperymentach (każdy przeprowadzono w 2 powtórzeniach).

Podobnie jak w przypadku MAO u człowieka (hMAO), ustalono, że wartości IC_{50} dla ciproxifanu u szczura (rMAO) plasują się w zakresie stężeń mikromolowych ($IC_{50,\ MAO\ A}$ = 37,5 ± 0,2 μM; $IC_{50,\ MAO\ B}$ = 15,4 ± 0,3 μM), z niewielką preferencją hamowania MAO B ($IC_{50,\ MAO\ B}$ / $IC_{50,\ MAO\ A}$ = 0,4) **[P3]**.

Rezultaty badań dotyczących hamowania aktywności MAO przez ciproxifan zapoczątkowały prace nad syntezą nowej grupy związków o podwójnym ukierunkowaniu farmakologicznym (*dual-targeting ligands*, DTLs), tj. hamujących MAO B i blokujących jednocześnie receptor histaminowy H_3. Wstępne wyniki tych badań zostały już przedstawione na 3 konferencjach [Zał. 4, pkt III.B.1, B.3 i B.4] oraz opublikowane [Affini *et al.*, *Eur J Med Chem* 2018; 148: 487-497].

DTLs stanowią obiecującą strategię terapeutyczną, niepowiązaną z receptorem dopaminergicznym, dla leczenia choroby Parkinsona [**P3**].

Udział mózgowych układów aminergicznych w patogenezie encefalopatii wątrobowej

Zespolenie wrotno-czcze (*portacaval shunt*, *portacaval anastomosis*, PCS) jest połączeniem żyły wrotnej z żyłą główną dolną, w wyniku którego krew z żyły wrotnej przedostaje się do żyły głównej. Powoduje to bezpośredni przepływ krwi z żołądka, jelit, trzustki i śledziony do krążenia ogólnego, z pominięciem wątroby, ograniczając w znacznym stopniu jej udział w procesach metabolicznych ustroju. Różne substancje wchłonięte z jelita (m.in. amoniak, merkaptany, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwas γ-aminomasłowy, aminokwasy aromatyczne i endogenne benzodiazepiny) nie są metabolizowane w wątrobie – trafiają do krążenia ogólnego, co powoduje intoksykację, prowadzącą do zaburzeń neurologicznych. U człowieka patologia ta wywołuje zaburzenia neuropsychiatryczne, określane mianem encefalopatii wątrobowej (*hepatic encephalopathy*, HE). HE często rozwija się także jako skutek dysfunkcji wątroby, np. w przebiegu marskości [Butterworth, 1996; Mas, 2006; Díaz-Gómez i wsp., 2011; Felipo, 2013; Dhanda i Sandhir, 2015].

W badaniach nad HE wykorzystuje się modele zwierzęce, ponieważ niezależnie od gatunku, zmiany biochemiczne w płynach ustrojowych i/lub narządach są bardzo zbliżone [Fogel i wsp., 1991a; Mas, 2006; Felipo, 2013; Dhanda i Sandhir, 2015]. Model PCS u szczura jest szeroko stosowany w badaniach dotyczących wpływu zaburzeń wątroby na funkcję i metabolizm mózgu. Zmiany indukowane zespoleniem wrotno-czczym odpowiadają typowi B encefalopatii wątrobowej (zgodnie z klasyfikacją podaną w 1998 r. podczas 11. Światowego Kongresu Gastroenterologicznego). Skutkiem jest atrofia wątroby bez oznak uszkodzenia narządu [Mas, 2006; Díaz-Gómez i wsp., 2011]. W OUN, wskutek zwiększonego stężenia we krwi aminokwasów aromatycznych: tryptofanu, fenyloalaniny, L-histydyny, L-tyrozyny i ich aktywnego transportu do mózgu, obserwuje się zwiększoną syntezę amin biogennych, zarówno tych, które pełnią rolę neuroprzekaźników (serotonina, 5-HT; dopamina, DA; histamina, HA), jak i amin śladowych (oktopamina) [Fogel i wsp., 1990, 1991a, 1999; Skowrońska i Albrecht, 2012]. Wcześniejsze badania przeprowadzone na modelu PCS u szczura wykazały 2 mechanizmy równoważące nadmierną produkcję amin w mózgu: wzmożony katabolizm i deponowanie w neuronach. Pierwszy, charakterystyczny dla 5-HT i DA, powiązany jest ze zwiększoną produkcją i stężeniem metabolitów indoloaminy (kwasu 5-hydroksyindolooctowego, 5-HIAA) i katecholaminy w mózgu (kwas

homowaniliowy, HVA) bez zmian w zawartości samych amin [Fogel i wsp., 1994; Lozeva i wsp., 2004]. Drugi proces regulacji dotyczy histaminy. We wczesnym okresie po zespoleniu wrotno-czczym, HA głównie deponowana jest w neuronach. W czasie dłuższym po zabiegu następuje także wzmożenie katabolizmu aminy, o czym świadczy zwiększone stężenie N-*tele*-metylohistaminy (t-MeHA) w mózgu – metabolitu HA [Lozeva i wsp., 2003]. Adaptacyjnie zwiększa się także aktywność MAO B – enzymu metabolizującego t-MeHA [Fogel i wsp., 2001, 2002]. Poziom HA w mózgu szczurów PCS jest znacznie wyższy (nawet 20-krotnie) w porównaniu ze zwierzętami operowanymi pozornie. Jest to spowodowane lepszym wysyceniem substratem L-histydyną dekarboksylazy histydynowej, enzymu odpowiedzialnego za syntezę HA, i ze względu na lokalizację ciał neuronów syntetyzujących HA w jądrze guzowo-suteczkowatym dotyczy przede wszystkim podwzgórza [Fogel i wsp., 1991a].

Podobne obserwacje dały także badania kliniczne. Podwyższone stężenie HA i t-MeHA wykryto między innymi *post mortem* w mózgach pacjentów z marskością wątroby, którzy zapadli w śpiączkę wątrobową [Lozeva i wsp., 2003].

Oprócz szeregu zaburzeń neurochemicznych w mózgu cechą charakterystyczną szczurów PCS jest wzmożona preferencja alkoholowa [Fogel i wsp., 1991b, 1997; de Waele i wsp., 1997]. Zjawisko picia alkoholu z wyboru zaobserwowano także w badaniach z wykorzystaniem innego modelu eksperymentalnego, prowadzącego do dysfunkcji wątroby, mianowicie u szczurów z marskością wątroby wywołaną dożołądkowym podawaniem hepatotoksyny – tioacetamidu [Fogel i wsp., 1997; Kruk i wsp., 1997; Stasiak i wsp., 2008]. Badania prowadzone nad identyfikacją przyczyn tego zjawiska wykazały, że zależy ono *per se* od stanu wątroby i ma charakter odwracalny. Poprawa funkcji narządu uzyskana w wyniku stosowania czynników hepatotropowych i procesów regeneracji, stymulowanych częściową hepatektomią, redukuje tę anormalną preferencję do alkoholu [Fogel i wsp., 1997; Kruk i wsp., 1997] (szerzej to zagadnienie omówione zostało w rozdziale 5.1.2 niniejszego opracowania). Z tego powodu u szczurów PCS badanie preferencji alkoholowej jest jednym ze sposobów oceny stanu wątroby i pośrednio pozwala na ocenę funkcji mózgu.

Biorąc pod uwagę powyższe spostrzeżenia, postanowiono sprawdzić, jakie będą skutki poprawy funkcji wątroby u szczurów PCS i dać odpowiedź na pytanie, czy zaburzenia neurochemiczne w mózgu są odwracalne.

W badaniach wykorzystano model PCS u szczura [**P4**]. Zespolenie wrotno-czcze, sposobem koniec do boku, wykonane zostało u szczurów wsobnych szczepu Lewis, wg procedury opisanej przez Lee i Fisher [1961]. Kontrolę stanowiły szczury operowane

pozornie. U zwierząt systematycznie monitorowano funkcję wątroby, badając stężenie mocznika w wydalanym moczu i stężenie aminokwasu L-histydyny w osoczu. Kontrolowano też preferencję alkoholową (badania w klatkach metabolicznych). Do eksperymentów włączono zwierzęta 6 miesięcy po operacji, z wyraźnymi przejawami zaburzeń charakterystycznych dla PCS: obniżonym o 50% wydalaniem mocznika, podwyższonym o 50% stężeniem L-histydyny w osoczu i zdeterminowaną preferencją alkoholową. Szczury PCS, proporcjonalnie do stopnia atrofii wątroby, zależnej od braku czynników hepatotropowych wskutek ograniczenia udziału wątroby w procesach metabolicznych, wypijały coraz więcej alkoholu z wyboru – po 13 tygodniach od wykonania zespolenia: 8,48 ± 0,83 ml 10% etanolu/100 g masy ciała, podczas gdy szczury kontrolne – poniżej 1 ml (0,89 ± 0,26 ml/kg) [**P4**].

Jako metodę poprawy funkcji wątroby, opierając się na własnych badaniach pilotażowych i licznych doniesieniach literaturowych, wybrano transplantację hepatocytów. Szczurom PCS, 6 miesięcy po operacji, podano zawiesinę hepatocytów (3 x 10^6 komórek /szczura), uzyskanych od zwierząt syngenicznych i przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną przez Seglena [1994], z zastosowaniem trawienia wątroby kolagenazą. Jako miejsce transplantacji, ze względu na bogate źródło czynników hepatotropowych, wybrano ogon trzustki. Po przeszczepie nadal monitorowano funkcję wątroby poprzez ocenę markerów biochemicznych i picia alkoholu z wyboru. Obserwację zakończono po 2 miesiącach od transplantacji. Transplantacja hepatocytów znormalizowała poziom L-histydyny w osoczu i zwiększyła ilość mocznika wydalanego w moczu. Szczury PCS, którym podano hepatocyty, wypijały także statystycznie mniej alkoholu z wyboru w porównaniu ze zwierzętami niepoddanymi przeszczepom [**P4**].

Post mortem w mózgach zwierząt ze wszystkich grup eksperymentalnych zbadano stężenie HA, t-MeHA, 5-HT, 5-HIAA oraz aktywność MAO A i B, zgodnie ze standardowo stosowanymi metodami, a trzustkę poddano ocenie histologicznej [**P4**]. Poziom HA, 5-HT i 5-HIAA oceniano w podwzgórzu, korze mózgowej, prążkowiu, śródmózgowiu, rdzeniu przedłużonym i móżdżku; stężenie t-MeHA i aktywność MAO – w podwzgórzu i korze mózgowej.

Post mortem, po dwóch miesiącach od transplantacji, badania histologiczne wykazały obecność hepatocytopodobnych komórek w miejscu ich implantacji. Dowodem, że przeszczepione hepatocyty podjęły funkcje syntezy i detoksykacji są także zmiany obserwowane przyżyciowo (wzrost ilości mocznika w moczu, spadek stężenia L-histydyny

w osoczu i ilości wypijanego alkoholu z wyboru) oraz zmiany neurochemiczne w mózgach zwierząt po przeszczepie.

Skutkiem zespolenia wrotno-czczego był statystycznie znamienny wzrost stężenia HA w większości badanych struktur mózgowych, przy czym w podwzgórzu przekraczało ono aż 20-krotnie poziom rejestrowany u zwierząt kontrolnych. Szczury PCS miały normalny poziom 5-HT we wszystkich ocenianych strukturach mózgu, przy zwiększonym ok. 2-3 razy stężeniu kwasu 5-HIAA. W podwzgórzu i korze mózgowej wykryto też, w porównaniu z kontrolą, większą aktywność MAO B.

U szczurów PCS poddanych transplantacji stężenie HA w podwzgórzu było znacznie niższe: poziom kontrolny przekraczało 6-krotnie. Spadek stężenia HA po przeszczepie powiązany był z obniżonym stężeniem t-MeHA w strukturze. U tych zwierząt odnotowano także mniejszą aktywność MAO B w podwzgórzu i korze mózgowej w porównaniu ze zwierzętami PCS bez terapii.

Transplantacja hepatocytów znormalizowała także metabolizm 5-HT w mózgu, czego dowodem jest istotne statystycznie niższe stężenie metabolitu aminy, 5-HIAA, w podwzgórzu, prążkowiu i międzymózgowiu, w odniesieniu do szczurów PCS bez przeszczepu.

Rezultaty te są zgodne z danymi uzyskanymi we wcześniejszych badaniach eksperymentalnych i klinicznych przeprowadzonych przez innych autorów. Transplantacja hepatocytów jest skutecznym sposobem przywrócenia funkcji wątroby w różnych warunkach niedomogi narządu: redukuje zaburzenia biochemiczne i wydłuża czas życia. Wpływa pozytywnie na metabolizm mózgowy i obwodowy w przebiegu różnych schorzeń wątroby. Podanie komórek do śledziony szczurom z marskością wątroby normalizowało czas protrombinowy, poziom albumin i bilirubiny w surowicy, a u szczurów PCS zapobiegało hiperamonemii, przeciwdziałając rozwojowi encefalopatii wątrobowej [Mariani i wsp., 2006; Cai i wsp., 2002]. Obniżony poziom amoniaku we krwi i niższy czas protrombinowy oraz lepszy wynik w testach oceniających stopień zaawansowania HE odnotowano także u ludzi z ostrą niewydolnością wątroby i ciężką postacią HE (stopień III-IV), którym przeszczepiono hepatocyty do wątroby i śledziony, a obecność transplantowanych komórek w miejscu implantacji potwierdzono *post mortem* [Bilir i wsp., 2000].

Generalnie, dane eksperymentalne i kliniczne sugerują, że transplantacja hepatocytów może być skuteczną terapią w różnych schorzeniach wątroby przebiegających z wyłączeniem funkcji narządu [Cai i wsp., 2002; Fitzpatrick i wsp., 2009]. Redukuje symptomy

encefalopatii wątrobowej i stanowi dobrą alternatywę dla ortotropowych przeszczepów wątroby.

Wyniki przedstawione w publikacji **P4** wyraźnie pokazują, że zmiany neurochemiczne w mózgu szczurów PCS, będące konsekwencją niedomogi wątroby, mają charakter odwracalny: przywrócenie funkcji narządu drogą transplantacji hepatocytów łagodzi zaburzenia w układach aminergicznych w ośrodkowym układzie nerwowym, a także normalizuje behawior, obniżając preferencję alkoholową. Jest to bardzo ważna obserwacja, kolejny dowód świadczący o zaangażowaniu amin biogennych w warunkowanie homeostazy ustroju.

*****

Podsumowując, patogeneza wielu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego powiązana jest z dysfunkcją mózgowych układów aminergicznych. Badania na modelach zwierzęcych dają szerszy wgląd w zmiany metaboliczne i mechanizmy adaptacyjne w układzie histaminergicznym i innych układach aminergicznych oraz umożliwiają ocenę skuteczności nowych leków i metod terapii. Przeprowadzone przeze mnie badania eksperymentalne poszerzyły wiedzę na temat zaburzeń występujących w przebiegu 2 chorób prowadzących do neurodegeneracji: demencji naczyniowej i encefalopatii wątrobowej oraz udowodniły skuteczność nowych terapii normalizujących poziom monoamin w mózgu.

Żywię nadzieję, że uzyskane przeze mnie rezultaty będą miały w przyszłości implikacje kliniczne, tj. przyczynią się do opracowania nowych skutecznych strategii terapeutycznych.

Rezultaty badań stanowiących osiągnięcie naukowe zostały także zaprezentowane w postaci komunikatów na 6 międzynarodowych konferencjach naukowych (Zał. 4, pkt III.B.17, 18, 20, 21, 22 i 25).

Badania nad udziałem mózgowych układów aminergicznych w warunkowaniu chorób neurodegeneracyjnych były prowadzone w ramach 4 projektów: działalności statutowej Zakładu Biochemii Hormonów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Zał. 4, pkt II.I.4), grantu finansowanego przez MNiSW (Zał. 4, pkt II.I.5) i 2 akcji COST: D34 i CM1103 (Zał. 4, pkt III.A.2 i 4).

Rezultaty badań dotyczących hamowania aktywności MAO przez ciproxifan zapoczątkowały prace nad syntezą nowej grupy związków o podwójnym ukierunkowaniu farmakologicznym (*dual-targeting ligands*, DTLs), tj. hamujących MAO B i blokujących

receptor histaminowy H_3. DTLs stanowią obiecującą strategię terapeutyczną, niepowiązaną z receptorem dopaminergicznym, dla leczenia choroby Parkinsona. Badania te prowadzone są między innymi w ramach akcji COST CA15135 (Zał. 4, pkt III.A.1), a ich wstępne wyniki zostały już zaprezentowane na 3 konferencjach międzynarodowych (Zał. 4, pkt III.B.1, 3 i 4).

Piśmiennictwo

Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 647-654.

Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2015; 11: 332-384.

Baronio D, Gonchoroski T, Castro K, Zanatta G, Gottfried C, Riesgo R. Histaminergic system in brain disorders: lessons from the translational approach and future perspectives. *Ann Gen Psychiatry* 2014; 18, 13: 34. doi: 10.1186/s12991-014-0034-y. eCollection 2014.

Battaglia V, Sanz E, Salvi M, Unzeta M, Toninello A. Protective effect of PF 9601N on mitochondrial permeability transition pore. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1440-1448.

Bhattacharjee AK, White L, Chang L i wsp. Bilateral common carotid artery ligation transiently changes brain lipid metabolism in rats. *Neurochem Res* 2012; 37: 1490-1498.

Bilir BM, Guinette D, Karrer F i wsp. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6: 32-40.

Birks J, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006 Jan 25; 1: CD001190.

Bolea I, Gella A, Monjas L i wsp. Multipotent, permeable drug ASS234 inhibits Aβ aggregation, possesses antioxidant properties and protects from Aβ-induced apoptosis in vitro. *Curr Alzheimer Res* 2013;10: 797-808.

Bowler JV. Vascular cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76, Suppl 5: v35-v44.

Butterworth RF. The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 235-244.

Cai J, Ito M, Nagata H i wsp. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 386-394.

Caraci F, Copani A, Nicoletti F, Drago F. Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *Eur J Pharmacol* 2010; 626: 64-71.

Chen H, Yoshioka H, Kim GS i wsp. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 1505-1517.

Choy M, Ganesan V, Thomas DL i wsp. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1066-1075.

Chui HC, Ramirez-Gomez L. Clinical and imaging features of mixed Alzheimer and vascular pathologies. *Alzheimers Res Ther* 2015; Feb 27; 7(1): 21. doi: 10.1186/s13195-015-0104-7. eCollection 2015.

Claeysen S, Bockaert J, Giannoni P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem Neurosci* 2015; 6: 940-943.

Cumming P, Vincent SR. Inhibition of histamine-N-methyltransferase (HNMT) by fragments of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (tacrine) and by beta-carbolines. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 989-992.

Cutillas B, Ambrosio S, Unzeta M. Neuroprotective effect of the monoamin oxidase inhibitor PF 9601N on rat nigral neurons after 6-OH-Dopamine striatal lesion. *Neurosci Lett* 2002; 329: 165-168.

de Waele J-P, Audet RM, Rose C, Butterworth RF. The portacaval-shunted rat: a new model for the study of the mechanism controlling voluntary ethanol consumption and ethanol preference? *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 305-310.

Dhanda S, Sandhir R. Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2015; 286: 222-235.

Dias KS, Viegas C Jr. Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12: 239-255.

Diaz NL, Waters CH. Current strategies in the treatment of Parkinson's disease and a personalized approach to management. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 1781-1789.

Díaz-Gómez D, Jover M, del-Campo JA, Galindo A, Romero-Gómez M. Experimental models for hepatic encephalopathy. *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 536-541.

DiNapoli VA, Huber JD, Houser K, Li X, Rosen CL. Early disruptions of the blood-brain barrier may contribute to exacerbated neuronal damage and prolonged functional recovery following stroke in aged rats. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 753-764.

Doody RS, Tariot PN, Pfeiffer E, Olin JT, Graham SM. Meta-analysis of six-month memantine trials in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007; 3: 7-17.

Du J, Ma M, Zhao Q i wsp. Mitochondrial bioenergetic deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia. *Neuroscience* 2013; 231: 345-352.

Du SQ, Wang XR, Xiao LY i wsp. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? *Mol Neurobiol* 2016. *Wersja elektroniczna: 20.05.2016 [Epub ahead of print].*

Facecchia K, Fochesato LA, Ray SD, Stohs SJ, Pandey S. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *J Toxicol* 2011 [serial on the Internet]; ID: 683728, [12 pages]; http://www.ncbi.nlm.nih.gov /pmcarticles/PMC3139184/pdf/JT2011-683728.pdf

Fakhfouri G, Rahimian R, Ghia JE, Khan WI, Dehpour AR. Impact of 5-HT(3) receptor antagonists on peripheral and central diseases. *Drug Discov Today* 2012; 17: 741-747.

Fakhoury M. Role of immunity and inflammation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 2015; 15: 63-69.

Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007; 54: 162-180.

Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 851-858.

Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009; 266: 339-357.

Fogel WA, Andrzejewski W, Maslinski C. Neurotransmitters in hepatic encephalopathy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1990; 50: 281-293.

Fogel WA, Andrzejewski W, Maslinski C. Brain histamine in rats with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1991a; 56: 38-43.

Fogel WA, Andrzejewski W, Maslinski C. Liver damage, voluntary alcohol intake and brain histamine. *Agents Actions* 1991b; 33: 150-153.

Fogel WA, Andrzejewski W, Sasiak K. Long-term portocaval shunt and changes in rat brain amine systems. *Neurobiology (Bp)* 1999; 7: 413-420.

Fogel WA, Kruk A, Kozlowska M, Sasiak K, Andrzejewski W, Maslinski C. Liver regeneration attenuates increased voluntary alcohol intake evoked by the liver damage. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 732-737.

Fogel WA, Michelsen KA, Granerus G i wsp. Neuronal storage of histamine in the brain and tele-methylimidazoleacetic acid excretion in portocaval shunted rats. *J Neurochem* 2002; 80: 375-382.

Fogel WA, Michelsen KA, Panula P, Sasiak K, Andrzejewski W. Cerebral and gastric histamine system is altered after portocaval shunt. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 657-670.

Fogel WA, Tuomisto L, Sasiak K i wsp. Effect of pargyline on brain N-telemetylhistamine in portocaval shunted rats. Relation to amine neurotransmitters. *J Neurochem* 1994; 62: 615-620.

Fowler CJ, Tipton KF. Concentration dependence of the oxidation of tyramine by the two forms of rat liver mitochondrial monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 3329-3332.

Gallagher DA, Schapira AH. Etiopathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 860-868.

Garcia-Alloza M, Gil-Bea FJ, Diez-Ariza M i wsp. Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 2005; 43: 442-449.

Gómez N, Balsa D, Unzeta M. A comparative study of some kinetic and molecular properties of microsomal and mitochondrial monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3407-3413.

Gorelick PB, Scuteri A, Black SE i wsp. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 42: 2672-2713.

Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 26. doi: 10.1186/ 1742-2094-8-26.

Guglielmotto M, Aragno M, Autelli R i wsp. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha. *J Neurochem* 2009; 108: 1045-1056.

He XL, Wang YH, Gao M i wsp. Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res* 2009; 1249: 212-221.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 2003; 60: 1119-1122.

Hebert LE, Weuve J, Scherr PA and Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 2013; 80: 1778-1783.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 358-372.

Hermanowicz N. Drug therapy for Parkinson's disease. *Semin Neurol* 2007; 27: 97-105.

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17: 796-808.

Ishunina TA, Kamphorst W, Swaab DF. Metabolic alterations in the hypothalamus and basal forebrain in vascular dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 1243-1254.

Ismaili L, Refouvelet B, Benchekroun M i wsp. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2016; pii: S0301-0082(15)00162-8. doi: 10.1016/j.pneurobio. 2015.12.003. *Wersja elektroniczna [Epub ahead of print]*.

Jian H, Yi-Fang W, Qi L, Xiao-Song H, Gui-Yun Z. Cerebral blood flow and metabolic changes in hippocampal regions of a modified rat model with chronic cerebral hypoperfusion. *Acta Neurol Belg* 2013; 113: 313-317.

Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 140-143.

Knoll J. Deprenyl (selegiline): the history of its development and pharmacological action. *Acta Neurol Scand Suppl* 1983; 95: 57-80.

Kruk A, Kozlowska M, Kierska D, Sasiak K, Fogel WA. Can liver function improvement by glucagon and insulin therapy modify preference for alcohol caused by the liver cirrhosis? *J Physiol Pharmacol* 1997; 48, Suppl. 2: 130-136.

Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 1998; 112: 1199-1208.

Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1220-1228.

Lee SH, Fisher B. Portocaval shunt in the rat. *Surgery* 1961; 50: 668-672.

León R, Marco-Contelles J. A step further towards multitarget drugs for Alzheimer and neuronal vascular diseases: targeting the cholinergic system, amyloid-β aggregation and Ca(2+) dyshomeostasis. *Curr Med Chem* 2011; 18: 552-576.

Li CJ, Lu Y, Zhou M i wsp. Activation of GABAB receptors ameliorates cognitive impairment via restoring the balance of HCN1/HCN2 surface expression in the hippocampal CA1 area in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Mol Neurobiol* 2014; 50: 704-720.

Lieberman A. Long-term experience with selegeline and levodopa in Parkinson's disease. *Neurol* 1992; 42, Suppl: 32-36.

Ligneau X, Lin J, Vanni-Mercier G i wsp. Neurochemical and behavioral effects of ciproxifan, a potent histamine H3-receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 658-666.

Lindvall O. Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease. *J Intern Med* 2016; 279: 30-40.

Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L i wsp. Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol* 2004; 40: 742-748.

Lozeva V, Tuomisto L, Tarhanen J, Butterworth RF. Increased concentrations of histamine and its metabolite, tele-methylhistamine and down-regulation of histamine H3 receptor sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *J Hepatol* 2003; 39: 522-527.

Luca M, Luca A, Calandra C. The role of oxidative damage in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 504678. doi: 10.1155/2015/504678. *Wersja elektroniczna: 2.08.2015.*

Łazewska D, Kieć-Kononowicz K. Recent advances in histamine H3 receptor antagonists/ inverse agonists. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20: 1147-1169.

Łazewska D, Kuder K, Ligneau X i wsp. Diether derivatives of homo- or substituted piperidines as non-imidazole histamine H3 receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 3037-3042.

Marchant NL, Reed BR, Sanossian N i wsp. The aging brain and cognition: contribution of vascular injury and aβ to mild cognitive dysfunction. *JAMA Neurol* 2013; 70: 488-495.

Marchesi, VT. Alzheimer's disease and CADASIL are heritable, adult-onset dementias that both involve damaged small blood vessels. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 949-955.

Mariani P, Coudray-Lucas C, Baudrimont M i wsp. Glutamine metabolism and neuropathologic disorders in experimental hepatic encephalopathy: effect of transplanted hepatocytes. *Surgery* 1996; 120: 93-99.

Martorana A, Koch G. "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?" *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 252. doi: 10.3389/fnagi.2014.00252. eCollection 2014.

Mas A. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion* 2006; 73, Suppl 1: 86-93.

Morisset S, Traiffort E, Schwartz JC. Inhibition of histamine versus acetylcholine metabolism as a mechanism of tacrine activity. *Eur J Pharmacol* 1996; 315: R1-R2.

Musiał A, Bajda M, Malawska B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2654-2679.

Ni J, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 1994; 653: 231-236.

Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 266-272.

Panula P, Chazot PL, Cowart M i wsp. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 2015; 67: 601-655.

Passani MB, Blandina P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 242-249.

Passani MB, Lin JS, Hancock A, Crochet S, Blandina P. The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 618-625.

Pérez V, Romera M, Lizcano JM, Marco JL, Unzeta M. Protective effect of PF 9601N, a novel MAO B inhibitor, on dopamine lesioned PC12 cells. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 713-716.

Perez V, Unzeta M. PF 9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine], a new MAO-B inhibitor, attenuates MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice. *Neurochem Int* 2003; 42: 221-229.

Pérez V, Unzeta M. PF9601N, a new MAO B inhibitor, attenuates MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice. *Neurochem Int* 2003; 42: 221-239.

Peters R. Blood pressure, smoking and alcohol use, association with vascular dementia. *Exp Gerontol* 2012; 47: 865-872.

Raffaitin C, Gin H, Empana JP i wsp. Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care* 2009; 32: 169-174.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 137-152.

Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 2007; 82: 297-325.

Rezak M. Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. *Dis Mon* 2007; 53: 214-222.

Riederer P, Laux G. MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* 2011; 20: 1-17.

Rosenberg GA, Bjerke M, Wallin A. Multimodal markers of inflammation in the subcortical ischemic vascular disease type of vascular cognitive impairment. *Stroke* 2014; 45: 1531-1538.

Sanz E, Quintana A, Hidalgo J, Marco JL, Unzeta M. PF 9601N confers MAOB independent neuroprotection in ER-stress-induced cell death. *Mol Cell Neurosci* 2009; 41: 19-31.

Sanz E, Romera M, Bellik L, Marco JI, Unzeta M. Indolalkylamines derivatives as antioxidant and neuroprotective agents in an experimental model of Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 2004; 10: BR477-484.

Saura J, Luque JM, Cesura AM i wsp. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience* 1994; 62: 15-30.

Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol* 2003; 2: 539-547.

Seglen PO. Isolation of hepatocytes. In: Celis JE (ed). Cell Biology: A Laboratory Handbook, vol. 1. Aademic Press Inc, San Diego, CA, USA, 1994; 96-102.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766.

Sharp SI, Aarsland D, Day S, Sonnesyn H, Ballard C. Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry* 2011; 26: 661-669.

Shih JC, Chen K, Geha RM. Determination of regions important for monoamine oxidase (MAO) A and B substrate and inhibitor selectivities. *J Neural Transm* 1998; 52, Suppl: 1-8.

Simoni E, Daniele S, Bottegoni G i wsp. Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2012; 55: 9708-9721.

Skowrońska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res* 2012; 21: 236-244.

Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C i wsp. The public health impact of Alzheimer's disease, 2000–2050: potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health* 2002; 23: 213–231.

Stasiak A, Fogel WA. High voluntary alcohol consumption, in experimental liver cirrhosis is hardly responsive to opioid antagonist treatment. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 101-114.

Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1961-1969.

Terry AV Jr, Buccafusco JJ, Wilson C. Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. *Behav Brain Res* 2008; 195: 30-38.

Tetrud JW, Langston JW. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science* 1989; 245: 519-522.

Tonelli M, Catto M, Tasso B i wsp. Multitarget Therapeutic Leads for Alzheimer's Disease: Quinolizidinyl Derivatives of Bi- and Tricyclic Systems as Dual Inhibitors of Cholinesterases and beta-Amyloid (Abeta) Aggregation. *ChemMedChem* 2015; 10: 1040-1053.

Toyran N, Zorlu F, Donmez G, Oge K, Severcan F. Chronic hypoperfusion alters the content and structure of proteins and lipids of rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Eur Biophys J* 2004; 33: 549-554.

Trillo L, Das D, Hsieh W i wsp. Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37: 1363-1379.

Unzeta M, Esteban G, Bolea I i wsp. *Front Neurosci* 2016 May 25; 10: 205. doi: 10.3389/fnins.2016.00205. eCollection 2016.

Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol* 2015; 272: 97-108.

Weyler W, Hsu YP, Breakefield XO. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 391-417.

Xi Y, Wang M, Zhang W i wsp. Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Learn Mem* 2014; 109: 7-19.

Yatomi Y, Tanaka R, Shimura H i wsp. Chronic brain ischemia induces the expression of glial glutamate transporter EAAT2 in subcortical white matter. *Neuroscience* 2013; 244:113-121.

Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 295-309.

Zlokovic BV. New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2008; 5: 409-414.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

5.1.1. Praca magisterska

Pierwsze badania naukowe realizowałam w ramach pracy magisterskiej pt. „Rola jądra pośrodkowego szwu w regulacji zachowania emocjonalno-obronnego kota", wykonywanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Romaniuka w Katedrze Neurofizjologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego (obecnie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska). Miały one na celu poszerzenie wiedzy odnośnie udziału mózgowego układu serotoninergicznego w regulacji zachowania emocjonalno-obronnego.

Neurony syntetyzujące serotoninę zgrupowane są w mózgu w jądrach szwu, położonych w linii środkowej rdzenia przedłużonego, mostu i śródmózgowia, gdzie skupiają się w 3 grupach: tylnej, środkowej i przedniej. Jądro pośrodkowe szwu (MRN, *median raphe nucleus*) należy do grupy przedniej. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach oceniałam wpływ uszkodzenia MRN za pomocą neurotoksyny 5,6-dihydroksytryptaminy (5,6-DHT; *5,6-dihydroxytryptamine*) na reakcję emocjonalno-obronną i aktywność ruchową kotów.

Zwierzęta na wstępie poddano operacjom stereotaktycznym, implantując do mózgu 3 kaniule: jedną do MRN i dwie – obustronnie – do podwzgórza. Badania zostały przeprowadzone w oparciu o eksperymentalny model reakcji emocjonalno-obronnej, indukowanej obustronnym podaniem do podwzgórza karbacholu (4 μg/1 μl); reakcja pokarbacholowa stanowi odpowiednik naturalnego zachowania kota w sytuacjach grożącego mu niebezpieczeństwa.

Karbachol jest parasympatykomimetykiem, syntetyczną pochodną acetylocholiny o podwójnym działaniu: jest agonistą receptorów muskarynowych i jednocześnie słabym inhibitorem cholinoesterazy. Działanie związku jest długotrwałe ($t_{1/2}$ wynosi ok. 8 h) dzięki temu, że nie ulega szybkiej inaktywacji pod wpływem cholinoesterazy.

Oprócz badań behawioralnych, *post mortem* u kotów analizowano także zmiany neurochemiczne, jakie wystąpiły w obszarach emocyjnych mózgu i korze czołowej po tych uszkodzeniach.

Pokarbacholową reakcję emocjonalno-obronną rejestrowano dwukrotnie, po 3 tygodniach od implantacji kaniul, z 7-dniową przerwą. Przed podaniem agonisty oceniano statyczną i dynamiczną aktywność ruchową zwierząt przy użyciu kamery

telewizyjnej. Natychmiast po iniekcji karbacholu koty umieszczano w specjalnych klatkach pozwalających ocenić intensywność pobudzenia emocjonalno-obronnego. Ewidencjonowano okres utajenia reakcji, liczbę warknięć i łączny czas ich trwania oraz całkowity czas wokalizacji. Po 4 tygodniach od drugiej rejestracji pokarbacholowej, grupie eksperymentalnej podano do MRN 5,6-DHT (20 μg/2 μl) i ponownie mierzono natężenie reakcji pokarbacholowej w 5., 10. i 15. dniu od iniekcji neurotoksyny (grupa kontrolna otrzymała 2 μl 0,2% kwasu askorbinowego). Po ostatniej ewaluacji koty zostały zdekapitowane; mózgi zabezpieczono do badań neurochemicznych. W podwzgórzu przednim i tylnym (HA, HP), istocie szarej środkowej śródmózgowia (GC), ciele migdałowatym (AM) i korze czołowej (CTX) oznaczono metodą HPLC-ECD stężenie serotoniny (5-HT), noradrenaliny (NA), dopaminy (DA), kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), kwasu homowanilinowego (HVA) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA).

Podczas badań behawioralnych stwierdzono, że jednorazowe podanie 5,6-DHT do MRN w dawce 20 μg/2 μl wywołuje u kotów istotny statystycznie spadek aktywności ruchowej. W przypadku reakcji emocjonalno-obronnej zaś, poza wydłużeniem okresu utajenia (tj. czasu od iniekcji karbacholu do pojawienia się pierwszych symptomów pobudzenia), nie uzyskano zmian istotnych statystycznie w natężeniu rejestrowanych parametrów.

Zmianom behawioralnym towarzyszyły zmiany neurochemiczne w mózgu. We wszystkich badanych strukturach mózgu po podaniu 5,6-DHT stwierdzono, w porównaniu z grupą kontrolną, spadek stężenia 5-HT i metabolitu aminy: 5-HIAA. W HA, HP, GC i CTX odnotowano także znamienne statystycznie obniżenie stężenia NA. Zmiany w mózgu dotyczyły także poziomu DA i jej metabolitów – HVA i DOPAC, aczkolwiek istotny statystycznie spadek stwierdzono tylko w przypadku DOPAC w CTX.

Na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że jednorazowe podanie 5,6-DHT do MRN w dawce 20 μg/2 μl tylko w nieznacznym stopniu wpływa na reakcję emocjonalno-obronną u kota, wywołaną dopodwzgórzową iniekcją karbacholu.

Dane biochemiczne świadczą, że 5,6-DHT jest względnie specyficzną neurotoksyną dla neuronów serotoninergicznych, gdyż wywołuje zaburzenia również w innych systemach aminergicznych mózgu.

Pracę magisterską obroniłam 23 czerwca 1994 r. z wynikiem bardzo dobrym, uzyskując tytuł magistra biologii w zakresie fizjologii.

5.1.2. Rozprawa doktorska

Po ukończeniu studiów wyższych na Uniwersytecie Łódzkim, 1 października 1994 r. rozpoczęłam pracę jako asystent w Zakładzie Amin Biogennych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi w Zespole Metabolizmu kierowanym przez prof. dr hab. Wiesławę Agnieszkę Fogel. Główne moje zainteresowania badawcze koncentrowały się wokół związku przyczynowego pomiędzy uszkodzeniem wątroby a wzmożoną konsumpcją alkoholu. Była to stosunkowo nowa obserwacja. Wcześniej przedmiotem licznych badań, zarówno eksperymentalnych, jak i klinicznych, były różnego rodzaju uszkodzenia i dysfunkcje wątroby spowodowane nadużywaniem alkoholu, a na temat niedomogi wątroby jako czynnika sprawczego zwiększonej preferencji alkoholowej było wiadomo niewiele.

Badania prowadzone w Zakładzie Amin Biogennych wskazywały, że szczury z atrofią wątroby (zapoczątkowaną chirurgicznie poprzez wykonanie zespolenia wrotno-czczego) wypijają więcej alkoholu etylowego, proporcjonalnie do zaniku wątroby, niż zwierzęta kontrolne (szerzej te kwestie przedstawiono w rozdziale 4.3). W swoich badaniach udowodniłam, że do takich samych rezultatów prowadzi także inne uszkodzenie narządu: marskość wywołana podawaniem hepatotoksyny – tioacetamidu (TAA).

Celem pracy doktorskiej było wykazanie związku przyczynowego pomiędzy uszkodzeniem wątroby a wzmożoną preferencją alkoholu oraz próba zidentyfikowania mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw tego zjawiska.

Badania zostały przeprowadzone na szczurach (samce szczepu Wistar) z marskością wątroby wywołaną długotrwałym podawaniem TAA. Model ten jest porównywalny pod względem biochemicznym i morfologicznym z marskością u ludzi (marskość guzkowa). Do badań zostały wyselekcjonowane zwierzęta niepreferujące alkoholu.

Szczury z marskością wątroby, proporcjonalnie do stopnia rozwoju niewydolności narządu, statystycznie częściej niż zwierzęta zdrowe wybierały alkohol. Systematycznie badane przyżyciowe parametry oceny funkcji wątroby (stężenie bilirubiny w osoczu, czas protrombinowy) u szczurów traktowanych TAA wiarygodnie odzwierciedlały stopień niewydolności narządu. Badania wykonywane *post mortem* (w tym: oznaczenia stężenia hydroksyproliny i histaminy) oraz wartość indeksu wątrobowego potwierdzały poważne uszkodzenie wątroby (zwłóknienie, marskość). Ocena preferencji alkoholowej dokonywana była na podstawie testów wyboru przeprowadzanych w klatkach metabolicznych, które zapewniały wolny dostęp do wody, 10% roztworu alkoholu etylowego i paszy (*two bottle choice test*).

W serii doświadczeń przeprowadzonych na szczurach z potioacetamidową marskością wątroby i wyraźnie zaznaczoną preferencją alkoholową udowodniłam, że poprawa funkcji wątroby uzyskana na drodze regeneracji indukowanej częściową hepatektomią lub czynnikami hepatotropowymi (insulina i glukagon) ogranicza konsumpcję alkoholu. Uzyskane rezultaty wskazują, że picie alkoholu jest związane ze stanem funkcjonalnym wątroby. Obserwacja ta ma implikacje kliniczne – uszkodzenie wątroby może predestynować do alkoholizmu.

Poszukując mechanizmów biochemicznych warunkujących wzmożoną preferencję alkoholową u szczurów z marskością potioacetamidową, sprawdziłam 3 z aktualnie dyskutowanych w literaturze koncepcji dotyczących patogenezy alkoholizmu: deficyt w układzie serotoninergicznym w mózgu, zaburzenie w układzie renina-angiotensyna i udział mózgowego układu opioidowego.

Szczury z marską wątrobą, pijące z wyboru duże ilości alkoholu, miały bardzo zbliżony poziom 5-HT i 5-HIAA do wartości odnotowanych w grupie zwierząt kontrolnych. Sugeruje to, że mało prawdopodobne jest, aby za ich zwiększoną preferencję alkoholową odpowiadały zaburzenia w układzie serotoninowym w OUN. Kaptopril (inhibitor konwertazy angiotensyny, enzymu przekształcającego angiotensynę I w angiotensynę II) podawany przez 10 dni podskórnie w dawce 20 mg/kg masy ciała nie zmieniał ani konsumpcji alkoholu z wyboru, ani ilości wypijanej wody. Spostrzeżenie to jednakże nie przesądza o braku udziału układu renina-angiotensyna w patomechanizmie alkoholizmu wywołanego marskością wątroby.

W odniesieniu do układu opioidowego, u zwierząt z potioacetamidową marskością wątroby i silnie zaznaczoną preferencją alkoholową, trzykrotnie sprawdzono także skuteczność niespecyficznych antagonistów receptorów opioidowych w ograniczaniu picia alkoholu z wyboru, każdorazowo podając związki podskórnie, w dawce 10 mg/kg masy ciała, przez 5-10 dni. Rozpatrując wyniki wszystkich eksperymentów stwierdzono, że działanie naloksonu i naltreksonu u szczurów z uszkodzoną wątrobą skierowane jest raczej na obniżenie całkowitej konsumpcji płynów, a nie specyficznie – konsumpcji alkoholu. U szczurów z marskością wątroby oraz kontrolnych przeprowadzono także charakterystykę mózgowych receptorów typu *mu* z zastosowaniem metody wiązania radioligandu - [^{3}H](D-Ala^2, -N-MePhe^4, Glyol^5) Enkefaliny (*receptor binding*). U szczurów TAA – w porównaniu z kontrolnymi – odnotowano mniejszą gęstość receptorów *mu*, podczas gdy powinowactwo znakowanego agonisty do receptorów było zbliżone. Uzyskane rezultaty wskazują na pewne

zmiany w układzie opioidowym u szczurów TAA. Jednakże, nawet jeśli układ opioidowy jest zaangażowany w rozwój nadmiernej preferencji alkoholu, to nie pełni on roli wiodącej.

Przeprowadzone przez mnie eksperymenty udowodniły znaczenie komponentów somatycznych / patofizjologicznych (obok psychicznych i społecznych) w przebiegu choroby alkoholowej, powiązanych z funkcją wątroby. Uwzględnienie uszkodzenia wątroby jako pierwotnego czynnika patogenetycznego w warunkowaniu wzmożonej preferencji alkoholowej poszerza zakres zainteresowania tym narządem w chorobie alkoholowej. Badania te były częściowo subwencjonowane przez Komitet Badań Naukowych (grant promotorski 4PO5A 141.14; Zał. 4, pkt II.I.8). Rezultaty zostały włączone do rozprawy doktorskiej pt. „*Uszkodzenie wątroby a wzmożona preferencja alkoholu u szczura. Poszukiwanie mechanizmów leżących u jej podstaw*" oraz opublikowane w 2 pracach (Zał. 4, pkt II.A.12 i II.A.13) i przedstawione w formie 4 komunikatów na konferencjach naukowych (Zał. 4, pkt III.B.36-39). Obrona doktoratu odbyła się 19 maja 1999 r. na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie: Uniwersytet Medyczny). Promotorem pracy była prof. dr hab. Wiesława Agnieszka Fogel, recenzentami zaś: prof. dr hab. Janusz Greger z Akademii Medycznej w Łodzi i prof. dr hab. Romuald Langwiński z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Praca została wyróżniona przez Radę Wydziału Lekarskiego; 25 maja 1999 r. nadano mi stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

5.2.Główne prace badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora moja działalność naukowa koncentrowała się nadal na badaniach podstawowych mających na celu poznanie funkcji amin biogennych (głównie histaminy) w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych.

W latach 2001-2006 miałam przerwę w pracy naukowej; w grudniu 2003 r. został rozwiązany Zakład Amin Biogennych PAN w Łodzi.

2 października 2006 r. zostałam zatrudniona na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, w nowo powstałym Zakładzie Biochemii Hormonów, kierowanym przez Panią Profesor W. Agnieszkę Fogel, gdzie wznowiłam pracę naukowo-badawczą.

Tematyka moich prac po uzyskaniu stopnia doktora koncentrowała się głównie wokół następujących zagadnień:

- rola histaminy i innych amin biogennych w różnych procesach fizjologicznych i stanach patologicznych,

- poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za preferencję alkoholową wywołaną dysfunkcją wątroby (kontynuacja badań),
- charakterystyka eksperymentalnego modelu encefalopatii wątrobowej (kontynuacja badań),
- ocena możliwości terapeutycznego wykorzystania nowo zsyntetyzowanych związków wpływających na układ histaminowy (przede wszystkim ligandów H_3R i H_4R).

Wszystkie projekty badawcze, wykonane w oparciu o zwierzęce modele eksperymentalne, były pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

5.2.1. Rola histaminy w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u szczurów

Histamina obecna jest w komórkach enterochromatofilnych i zwojach śródściennych w przewodzie pokarmowym. Działając na różne typy receptorów (H_1-H_4) pełni tu liczne funkcje: pobudza sekrecję soku żołądkowego i śluzu, wpływa na motorykę przewodu pokarmowego, bierze udział w rekcjach alergicznych i zapalnych, stymuluje procesy wzrostu i regeneracji oraz zwiększa produkcję kolagenu. Receptory histaminowe typu H_4, zidentyfikowane jako ostatnie, występują głównie na leukocytach i odgrywają rolę w aktywacji komórek warunkujących przebieg reakcji zapalnej – limfocytów, eozynofili i komórek tucznych.

Duże problemy terapeutyczne sprawiają przewlekłe zapalne choroby jelit (*inflammatory bowel disease*, IBD), w tym wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*, UC). Morfologicznie UC charakteryzuje się przerostem śluzówki jelita i hiperplazją komórek tucznych w warstwie podśluzówkowej, przy czym zapalenie ogranicza się głównie do błony śluzowej. W aktywnej postaci choroby w kryptach gruczołów śluzówki mogą tworzyć się ropnie, czemu towarzyszą wysięki i obecność neutrofili. W przebiegu choroby zaobserwowano także pewne inklinacje powiązane z układem histaminowym: wzrost uwalniania mediatorów przez komórki tuczne, obniżenie aktywności oksydazy diaminowej (DAO) i nasilenie wydalania *N*-metylotransferazy histaminy (HMT) z moczem (enzym HMT jest traktowany jako marker IBD).

Celem projektu było sprawdzenie, czy antagoniści receptorów histaminowych modyfikują przebieg zapalenia w jelicie grubym. Badania miały charakter eksperymentalny – przeprowadzone zostały na szczurach (samcach szczepu Wistar) z wrzodziejącym zapaleniem

jelita grubego, wywołanym jednorazowym doodbytniczym podaniem 4% kwasu octowego. U zwierząt z UC, począwszy od dnia indukcji zapalenia, przez 5 dni, stosowano: ketotifen (antagonista H_1R; 2,5 mg/kg, podawany sondą do żołądka), ranitydynę (antagonista H_2R; 40 mg/kg, podawanie dootrzewnowe) i tioperamid (antagonista H_3/H_4R; 2 mg/kg, podawanie dootrzewnowe). Jako markery zapalenia oznaczone zostały: stężenie ceruloplazminy w osoczu (Cp) i *post mortem* aktywność mieloperoksydazy (MPO) w jelicie. Tkanki objęte zapaleniem poddano ewaluacji makroskopowej; oceniono także stężenie histaminy w przewodzie pokarmowym i aktywności enzymów: DAO, HMT, MAO A i B.

Rozwój UC u szczura związany był z podwyższonym stężeniem Cp w osoczu i większą aktywnością MPO w jelicie. We wszystkich grupach traktowanych antagonistami receptorów histaminowych, w porównaniu ze zwierzętami niepoddanymi terapii, stwierdzono niższy poziom markerów zapalenia, a także mniejszy stopień uszkodzeń błony śluzowej jelita. UC powiązane było także z obniżonym stężeniem histaminy w przewodzie pokarmowym – stanu tego nie zmienił żaden podawany związek. W przypadku DAO, HMT i MAO B, nie wykryto różnic między grupami, podczas gdy aktywność MAO A była obniżona u wszystkich szczurów z UC, zarówno traktowanych, jak i nietraktowanych związkami, w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi (kontrolnymi).

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły wyciągnąć następujące wnioski:

- zastosowane związki korzystnie modyfikowały przebieg eksperymentalnego wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u szczura,
- zgodnie z doniesieniami literaturowymi, skuteczne działanie ketotifenu może wynikać ze stabilizacji komórek tucznych, a ranitydyny – z redukcji uszkodzeń tkanki jelita związanej z hamowaniem aktywności neutrofili, zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, poprzez spadek produkcji TNF-α,
- działanie tioperamidu związane jest raczej z aktywacją receptorów typu H_4 niż H_3 i może być efektem wpływu na procesy chemotaksji komórek biorących udział w rozwoju zapalenia (w tym komórek tucznych).

Rezultaty tych badań zostały zaprezentowane podczas 33. Konferencji *European Histamine Research Society* (Zał. 4, pkt III.B.29) i opublikowane w *Inflamm Res* (Zał. 4, pkt II.A.8).

5.2.2. Rola histaminy w funkcji gruczołu sutkowego

Jak już wielokrotnie podkreślano, histamina odgrywa dużą rolę w warunkach fizjologicznych i patologicznych, za pośrednictwem 4 typów receptorów: H_1-H_4. Jest jednym z czynników regulujących funkcję gruczołu mlekowego. Badania prowadzone na komórkach epitelialnych gruczołu sutkowego myszy wykazały ekspresję dekarboksylazy histydynowej – enzymu kluczowego dla powstawania histaminy. Komórki te syntetyzują i uwalniają aminę, w dynamice zależnej od stadium fizjologicznego narządu (fazy cyklu reprodukcyjnego).

Celem badań było określenie roli histaminy we wzroście i różnicowaniu gruczołu mlekowego u myszy w różnych stadiach cyklu reprodukcyjnego. Wykonane zostały badania receptorowe, prowadzące do identyfikacji receptorów histaminowych obecnych w gruczole mlekowym. W analizach typu *receptor binding*, przeprowadzonych na komórkach epitelialnych gruczołu sutkowego myszy (*Primary Mouse Mammary Epithelial Cells*, MMEC) i preparatach błonowych otrzymanych z całego gruczołu, wykorzystano: [^{3}H]-Mepyraminę, antagonistę H_1R; [^{3}H]-Tiotydynę, antagonistę/odwrotnego agonistę H_2R i [^{3}H]-R(-)-α-Metylohistaminę, antagonistę H_3R. MMEC zostały wyizolowane między 14. a 18. dniem ciąży; do badań użyto komórki świeżo pozyskane i utrzymywane w hodowli przez 72 godziny. Materiał błonowy z całego narządu przygotowano z gruczołów mlekowych w różnych stadiach reprodukcyjnych, tj. spoczynku, ciąży i laktacji.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały obecność receptorów histaminowych typu H_1 w gruczole mlekowym, we wszystkich fazach fizjologicznych, a uzyskane wartości K_d i B_{max} były porównywalne z wynikami otrzymanymi w badaniach wykonanych u człowieka i szczura. Miejsca wiązania [^{3}H]-Mepyraminy zostały także wykryte w MMEC. W gruczole mlekowym myszy stwierdzono także obecność receptorów typu H_3, przy czym B_{max} w tym przypadku – całkowita liczba miejsc wiązania radioligandu (miara gęstości receptorów) – była bardzo niska. W przeciwieństwie do innych autorów, analiza nie wykazała w badanym materiale obecności H_2R.

Na podstawie powyższych rezultatów wyciągnięty został wniosek, że histamina bierze udział we wzroście i różnicowaniu gruczołu mlekowego u myszy głównie za pośrednictwem aktywacji receptorów typu H_1 [Wagner i wsp., 2002; Zał. 4, pkt II.A.9].

5.2.3. Ocena układu opioidowego u szczurów z preferencją alkoholową wywołaną dysfunkcją wątroby (kontynuacja badań) – badania realizowane w ramach prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Zał. 4, pkt II.I.6)

Projekt badawczy był kontynuacją wcześniej prowadzonych badań dotyczących związku przyczynowego pomiędzy uszkodzeniem wątroby a wzmożoną preferencją alkoholu, i miał na celu pogłębienie wiedzy o mechanizmach neurobiologicznych odpowiedzialnych za wzmożone picie alkoholu u szczurów z dysfunkcją wątroby. Wiadomo, że uszkodzenie wątroby wywołuje preferencję alkoholową. Stwierdzono to na podstawie obserwacji opierających się o dwa krańcowo różne modele dysfunkcji narządu. Zarówno szczury z marskością wątroby wywołaną długotrwałym podawaniem tioacetamidu (marskość guzkowa), jak i szczury z zespoleniem wrotno-czczym, które inicjuje atrofię narządu, statystycznie częściej wybierają alkohol niż zwierzęta zdrowe. Wcześniejsze badania nad mechanizmami warunkującymi preferencję alkoholową indukowaną niedomogą wątroby wykazały pewne zmiany w mózgowym układzie opioidowym, tj. receptorach opioidowych typu *mu*. Charakterystyka kolejnego podtypu receptorów opioidowych – receptorów typu *delta*, pogłębiła wiedzę na ten temat (zmiany w gęstości receptorów *delta* odnotowano także i w innych modelach eksperymentalnych wzmożonej konsumpcji alkoholu).

W badaniach wykorzystano szczury z niedomogą wątroby wywołaną chirurgicznym zabiegiem zespolenia wrotno-czczego wg standardowej procedury opisanej przez Lee i Fisher [1961]. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym została wykonana operacja pozorowana. Preferencję alkoholową zwierząt oceniano na podstawie wyników testów wyboru (test dwóch pojników), przeprowadzanych systematycznie w specjalnych klatkach metabolicznych (Tecniplast, Gazzada, Włochy). W czasie trwania testu (72 godz.) szczury miały do wyboru dwa rodzaje płynów: wodę i 10% (v/v) alkohol etylowy. *Post mortem* dokonano weryfikacji stopnia atrofii wątroby poprzez ocenę makroskopową narządu oraz wyliczenie indeksu wątrobowego (masa wątroby/masa ciała x 100). Badania receptorowe zostały wykonane na mózgach szczurów z atrofią wątroby i dobrze zaznaczoną preferencją alkoholową oraz mózgach zwierząt kontrolnych. Charakterystyka receptora opioidowego typu *delta* została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki wiązania radioligandu [^{3}H]-DPDPE (Enkephalin, [Tyrosyl-2,6-^{3}H(N)]- (2-D-Penicillamine, 5-D-Penicillamine), agonista receptorów opioidowych typu *delta*) do receptora (*receptor binding*). Eksperymenty miały charakter wyznaczania krzywych saturacji (*saturation binding experiments*). Ocena badanych receptorów została dokonana na podstawie wyznaczenia parametrów K_d [nM] (stała

równowagi dysocjacji radioligand-receptor, miara powinowactwa ligandu do receptora) i B_{max} [fmol/mg białka] (całkowita liczba miejsc wiązania radioligandu, miara gęstości receptorów).

Wyniki badań receptorowych wskazują na pewne różnice w gęstości receptorów opioidowych typu *delta* i ich powinowactwie do specyficznego agonisty, [^{3}H]-DPDPE. U zwierząt PCS, wykazujących wzmożoną preferencję alkoholową, odnotowano, w porównaniu z kontrolą, większą gęstość badanych receptorów (B_{max}: 10.78 ± 1.23 fmol/mg białka w grupie PCS *vs.* 6.34 ± 0.3 fmol/mg białka w grupie kontrolnej), przy czym powinowactwo zastosowanego liganda do receptorów wydaje się być mniejsze (K_d odpowiednio: 1.04 ± 0.33 nM *vs.* 0.81 ± 0.09 nM).

Zwiększona preferencja alkoholowa u szczurów PCS może być zatem częściowo warunkowana zaburzeniem mózgowego układu opioidowego. Rezultaty tych badań zostały przedstawione w formie komunikatu zjazdowego i włączone do publikacji (Zał. 4, pkt II.A.6; pkt III.B.23).

5.2.4. Mechanizmy regulacji wzmożonej konsumpcji paszy u szczurów z zespoleniem wrotno-czczym (PCS, model encefalopatii wątrobowej) – badania realizowane w ramach prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Zał. 4, pkt II.I.7)

Histamina obecna w mózgu zaangażowana jest w generowanie / regulację różnych podstawowych funkcji i zachowania. Bierze między innymi udział w regulacji odżywiania, działając jako modulator hamujący. Suplementacja diety L-histydyną (prekursorem aminy) zmniejsza u szczurów spożycie paszy i odkładanie się tkanki tłuszczowej. Farmakologiczne blokowanie receptorów histaminowych typu H_1 powoduje zaś wzmożoną konsumpcję pożywienia.

W ośrodkową neurohormonalną kontrolę przyjmowania pożywienia zaangażowane są także inne układy monoaminergiczne, układy peptydergiczne, układ endokannabinoidowy i oreksynowy, które są aktywowane przez różne peptydy obwodowe (m.in. cholicystokininę, oreksynę, grelinę, polipeptyd YY, glukagonopodobny peptyd-1, leptynę, oksyntomodulinę).

Dane eksperymentalne wskazują na możliwe interakcje pomiędzy mózgowym układem histaminowym i oreksynowym, aczkolwiek nie są one jednoznaczne.

Wykazano m.in., że oreksyna – poprzez receptory OX_2 – może bezpośrednio pobudzać neurony histaminergiczne w jądrze guzowo-suteczkowym podwzgórza (TMN,

tubero-mammilary nucleus) oraz że działanie oreksygeniczne (pobudzające apetyt) oreksyny A jest zależne od histaminy.

Jak już wspomniano, zespolenie wrotno-czcze u szczura (PCS) prowadzi do szeregu zaburzeń w różnych układach aminergicznych, w tym do wysokiej akumulacji histaminy i wzmożonego uwalniania aminy z neuronów. Dotychczasowe badania prowadzone w oparciu o model PCS u szczura wykazały, że zwierzęta z zespoleniem wrotno-czczym, w porównaniu z kontrolnymi, jedzą znacznie więcej paszy, przy czym ich masa ciała jest mniejsza.

Celem niniejszego projektu była identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za regulację zwiększonej konsumpcji pokarmu u szczurów PCS. U samców szczepu Lewis, 6 miesięcy po wykonaniu zespolenia wrotno-czczego, z wyraźnymi symptomami atrofii wątroby i ukonstytuowanym wzmożonym spożyciem paszy, zastosowano związki wpływające na układ histaminowy, oreksynowy i kanabinoidowy.

Dzienne spożycie paszy oceniano przed i po podaniu: pirylaminy (antagonista receptora histaminowego H_1; 5 mg/kg, iniekcja dootrzewnowa), ranitydyny (antagonista receptora histaminowego H2; 70 μg, iniekcja dokomorowa) i SB 334867 (antagonista receptora oreksynowego OX_1; 10 mg/kg, iniekcja dootrzewnowa). Dootrzewnowo substancje podawano 30 min. przed badaniem spożycia pokarmu, a dokomorowo – 5 min. przed. Konsumpcję paszy oceniano po 6, 24 i 48 godzinach od iniekcji związków (badanie w klatkach metabolicznych).

W kolejnym eksperymencie sprawdzono wpływ podawania rimonabantu, selektywnego antagonisty receptora kannabinoidowego typu 1 (CB_1). Bloker podawany był bezpośrednio do żołądka (za pomocą sondy) przez 10 dni, w 3 dawkach: 1,5, 3 i 10 mg/kg masy ciała. Spożycie pokarmu oceniane było przed terapią, w trakcie jej trwania i po zakończeniu.

Po dekapitacji, w podwzgórzu zwierząt PCS i operowanych pozornie zmierzono stężenie histaminy i oreksyny A, a w osoczu – poziom cholecystokininy (*cholecystokinin octapeptide* CCK 26-33), insuliny i leptyny.

Szczury PCS miały o 30% mniejszą masę ciała niż zwierzęta kontrolne i spożywały odpowiednio o 150% i 200% więcej paszy i wody. Efekty interwencji farmakologicznych były lepiej widoczne u zwierząt operowanych pozornie niż u PCS. Podana domózgowo ranitydyna nie wpłynęła na konsumpcję paszy, pirylamina zaś spowodowała wzrost spożycia pokarmu w obu grupach, dając silniejszy efekt w grupie kontrolnej. Selektywny antagonista receptorów OX_1 – SB 334867 obniżył konsumpcję pożywienia w obu grupach, przy czym u szczurów kontrolnych rezultat ten utrzymywał się przez 24 godziny. W przypadku

rimonabantu, u szczurów kontrolnych najlepszy efekt, tj. obniżenie spożycia pokarmu, odnotowano po zastosowaniu największej dawki związku (10 mg/kg), podczas gdy u szczurów PCS najmniejsza użyta dawka (1,5 mg/kg) spowodowała w czasie terapii paradoksalnie wzrost spożycia paszy. W grupie PCS, której podawano antagonistę receptorów CB_1 w dawce 10 mg/kg, zwiększona konsumpcja pożywienia obserwowana była po zakończeniu terapii.

Post mortem u szczurów z zespoleniem wrotno-czczym, w porównaniu z grupą kontrolną, odnotowano w podwzgórzu wyższe stężenie histaminy i oreksyny A. W osoczu zwierzęta PCS miały wyższy poziom cholecystokininy i niższe stężenie leptyny. Nie stwierdzono natomiast różnic między grupami w poziomie insuliny.

W warunkach fizjologicznych endogenne kanabinoidy (anandamid, 2-arachidonoilo-glicerol), działając poprzez receptory CB_1, stymulują łaknienie, a stosowanie rimonabantu daje skutek przeciwny, na którym oparto w przeszłości jedną ze strategii leczenia otyłości. Brak anorektycznego działania związku u zwierząt PCS może się wiązać ze wzmożoną aktywnością mózgowego układu oreksynowego. Wcześniejsze badania wykazały bowiem, że oba układy, oreksynowy i kanabinoidowy, regulują łaknienie według wspólnego mechanizmu oraz że neurony oreksynergiczne w podwzgórzu zaangażowane są w redukcję apetytu zależną od receptorów CB_1.

Mechanizmy adaptacyjne powodują, że szczury PCS są mniej wrażliwe na obwodową i ośrodkową regulację łaknienia. Uzyskane rezultaty sugerują, że układ oreksynowy zaangażowany jest u szczurów z zespoleniem wrotno-czczym w regulację spożywania pożywienia. Wzmożona aktywność układu oreksynowego u zwierząt PCS (wzrost stężenia oreksyny A w podwzgórzu) może mieć charakter kompensacyjny – przeciwdziała nadmiernej aktywności układu histaminowego (wzrost stężenia histaminy, działanie anorektyczne).

Rezultaty badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za zwiększoną konsumpcję pożywienia przez szczury z zespoleniem wrotno-czczym zostały zaprezentowane na 2 konferencjach (Zał. 4, pkt III.B.24 i 26) oraz opublikowane w *J Physiol Pharmacol* (Zał. 4, pkt II.A.7).

5.2.5. Wpływ supresji sygnalizacji histaminowej na przebieg zapalenia mięśnia sercowego

W latach 2012-2016 byłam przede wszystkim zaangażowana – jako jeden z głównych wykonawców – w badania prowadzone w ramach projektu *Harmonia* pt. „Wpływ supresji

sygnalizacji histaminowej na przebieg i późniejsze skutki zapalenia mięśnia sercowego. Badania na szczurach z eksperymentalnym autoimmunologicznym *myocarditis*" (grant NCN, Załącznik 4, pkt II.I.3). Grant był realizowany we współpracy z prof. Holgerem Starkiem z Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Zadaniem grupy niemieckiej było dostarczenie narzędzia badawczego – ligandów receptorów histaminowych H_3 i H_4.

Celem projektu było ustalenie, czy związki działające na receptory histaminowe, zwłaszcza H_3R i H_4R, mogą modyfikować autoimmunologiczne zapalenie mięśnia sercowego i jego progresję w kierunku kardiomiopatii rozstrzeniowej. Badania miały charakter eksperymentalny, prowadzono je z wykorzystaniem modelu autoimmunologicznego zapalenia mięśnia sercowego u szczura (*experimental autoimmune myocarditis*, EAM); model ten jest odpowiednikiem poinfekcyjnej kardiomiopatii u człowieka.

Kardiomiopatia rozstrzeniowa (*dilated cardiomyopathy*, DCM) jest jedną z głównych przyczyn przewlekłej postępującej niewydolności serca. Charakteryzuje się powiększeniem komór serca (jednej bądź obu), przebiegającym z prawidłową grubością lub ścieńczeniem ścian serca oraz dysfunkcją skurczową. Postępujące upośledzenie funkcji skurczowej prowadzi do rozwoju zastoinowej niewydolności serca, której towarzyszą komorowe i nadkomorowe zaburzenia rytmu, zaburzenia przewodzenia, zatorowość płucna lub systemowa.

DCM należy do częstych schorzeń mięśnia sercowego (zapadalność: 1:2500 osób, trzecie miejsce wśród przyczyn niewydolności mięśnia sercowego) i charakteryzuje się wysoką śmiertelnością (20-50% pacjentów umiera w ciągu 5 lat od zachorowania). Etiopatogeneza schorzenia jest wieloczynnikowa. Rozwojowi DCM sprzyjają: mutacje genowe, infekcje predysponujące do rozwoju zapalenia mięśnia sercowego (wirusowe, wywoływane przez *Coxsackie*, adenowirusy, parwowirusy i HIV; bakteryjne, grzybicze i inne), substancje toksyczne (alkohol, chemioterapeutyki), zaburzenia immunologiczne, choroba niedokrwienna serca, zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, choroby nerwowo-mięśniowe; DCM może mieć także charakter idiopatyczny. Ostatnio, rozważając przyczyny dysfunkcji mięśnia sercowego, szczególnie podkreśla się znaczenie uwarunkowań genetycznych, procesów autoimmunologicznych i przewlekłych zmian zapalnych.

Leczenie DCM jest głównie objawowe – polega na podawaniu leków odciążających serce, poprawiających kurczliwość mięśnia sercowego, regulujących rytm serca i przeciwzakrzepowych. W przypadku kardiomiopatii pozapalnej stosuje się także leczenie przeciwzapalne. Niektórzy chorzy wymagają wszczepienia kardiowertera, w schyłkowej postaci choroby skuteczny może okazać się tylko przeszczep serca.

W przypadku, gdy zaburzenie funkcji serca wiąże się z postępującym zapaleniem, terapia powinna zmierzać do wygaszenia stanu zapalnego. Rola histaminy jako ważnego mediatora zapalenia jest bardzo dobrze udokumentowana. Badania doświadczalne, zwłaszcza z ostatnich lat, dostarczyły sporo danych o wpływie histaminy na reaktywność leukocytów. Dla przykładu, histamina może stłumić lub obniżyć uwalnianie histaminy z bazofilów i mastocytów, enzymu lizozomalnego z neutrofilów, produkcję i uwalnianie przeciwciał przez limfocyty, chemotaksję komórek do miejsc zapalnych, produkcję cytokin. Histamina swoje działanie realizuje za pośrednictwem 4 typów receptorów: H_1R, H_2R, H_3R i H_4R. Wszystkie receptory histaminowe wykryto w sercu człowieka i świnki morskiej; w różnoraki sposób wpływają one na funkcje narządu. Receptory histaminowe typu H_4 zlokalizowane są głównie w komórkach układu immunologicznego, stąd perspektywy terapeutycznego wykorzystania ligandów H_4R wiązane są m.in. z leczeniem chorób o podłożu zapalnym.

Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mięśnia sercowego (EAM) wywołane było u szczurów inbred szczepu Lewis (ok. 8-tygodniowych samców) przez dwukrotną immunizację miozyną pochodzącą z serca świni (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) w stosunku 1:1 z pełnym adiuwantem Freunda, w dawce 0,66 mg/szczura (w odstępie tygodniowym; podanie do poduszki tylnych kończyny). Ligandy receptorów histaminowych H_1R - H_4R podawano szczurom przez 14 dni, w dwóch konfiguracjach czasowych: począwszy od dnia pierwszej immunizacji lub w okresie 14-28 dni po niej.

U szczurów z EAM zastosowano: mepyraminę (antagonista H_1R; 20 mg/kg, dożołądkowo), ranitydynę (antagonista H_2R; 10 mg/kg, podskórnie), ciproxifan (antagonista H_3R; 1 mg/kg, podskórnie) i 3 związki działające na receptory H_4, podawane w dawce 1 mg/kg za pomocą wszczepionych podskórnie pompek osmotycznych (*Alzet osmotic pump*): ST1006 (częściowy agonista), ST994 (neutralny antagonista) i ST1012 (odwrotny agonista). Jako związek referencyjny użyto chinapryl (lek z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny; 20 mg/kg, podawany dożołądkowo), a za kontrolę posłużyły szczury z EAM traktowane solą fizjologiczną i szczury Lewis *intact*.

U zwierząt monitorowano przebieg procesu zapalenia poprzez przyżyciową ocenę parametrów zapalenia (pomiar aktywności ceruloplazminy w osoczu) oraz badano funkcję serca (echokardiograficzne badanie przezklatkowe przed eksperymentem oraz w 2., 3. i 4. tygodniu od wywołania EAM). *Post mortem* określano stopień hipertrofii serca oraz wykonywano badania histopatologiczne, RT PCR i biochemiczne. W pobranym materiale zbadano stężenie histaminy i hydroksyproliny; w toku są badania receptorowe.

U wszystkich szczurów EAM *post mortem* odnotowano znaczny przerost mięśnia sercowego, wyrażony zwiększonym stosunkiem masy serca do masy ciała, przy czym w grupie traktowanej ST994 indeks serca był najniższy. Stosunek masy serca do masy ciała w grupach EAM plasował się w zakresie od 0,62 do 0,99%, podczas gdy u zwierząt kontrolnych wynosił ok. 0,30%. Zmianom morfologicznym towarzyszyło upośledzenie funkcji serca, szczególnie kurczliwości mięśnia sercowego, zarejestrowane w badaniu echokardiograficznym, wyrażone między innymi mniejszą frakcją skracania (FS) i objętością wyrzutową lewej komory – LVEF (FS, % = 12,8 ± 2,87; LVEF, % = 31,6 ± 6,31). Oba te parametry były jednakże wyższe u szczurów leczonych antagonistami receptorów histaminowych, szczególnie mepyraminą. Z drugiej strony, *post mortem*, w grupie szczurów EAM, którym podawano mepyraminę, w lewej komorze badanie RT PCR wykazało więcej kopii mRNA TNF-alfa i mRNA MCP1 w porównaniu ze szczurami EAM niepoddanymi żadnej terapii, przy czym najwyższe poziomy obu transkryptów wykryto u zwierząt, którym podawano ranitydynę.

Konsekwencją EAM było także znaczne zwłóknienie mięśnia sercowego, odzwierciedlone *post mortem* wysokim poziomem hydroksyproliny. Cztery tygodnie po indukcji zapalenia, w lewej komorze stężenie hydroksyproliny u szczurów EAM od 2 do 5 razy przekraczało poziom kontrolny. Zawartość hydroksyproliny w sercu odwrotnie korelowała z poziomem histaminy. U zwierząt EAM – w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi – zaobserwowano spadek histaminy. Było to rezultatem znacznej progresji zwłóknienia.

Wszystkie zastosowane związki oddziałujące na receptory histaminowe, z wyjątkiem ST1012 (odwrotnego agonisty H_4R), skutecznie ograniczały procesy włóknienia mięśnia sercowego.

Przeprowadzone badania wykazały także, że ST994 (antagonista H_4R) hamuje proces zapalny w mięśniu sercowym na wczesnym etapie, zapobiegając infiltracji komórek zapalnych. Wskazują na to zbliżone do wartości kontrolnych parametry funkcjonalne lewej komory serca u szczurów, którym podawano związek. Objętość wyrzutowa lewej komory (LVEF) u tych zwierząt była na poziomie 61%, a frakcja skracania (LVFS) – 31%. U kontroli parametry te wynosiły odpowiednio 67% i 32%. W grupie tej odnotowano także najniższą śmiertelność.

Ocenę działania antagonistów receptorów histaminowych u szczurów z EAM utrudniały duże różnice indywidualne w postępie choroby oraz wysoka śmiertelność zwierząt, mimo prowadzenia badań na wsobnym szczepie (szczury Lewis).

Na podstawie przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że spośród zastosowanych związków, najlepiej rokujące działanie u szczurów z EAM wykazał neutralny antagonista receptorów H_4R, związek ST994.

Przedstawione powyżej rezultaty zostały zaprezentowane w formie 6 komunikatów na międzynarodowych konferencjach (Zał. 4, pkt III: B.2, B.5, B.7, B.9, B.12 i B.14) oraz włączone do publikacji: Stasiak *et al.*, 2018 (Zał. 4. pkt II.A.2).

5.2.6. Ośrodkowe działanie nowych nieimidazolowych ligandów receptora histaminowego H_3

Badania prowadzone w ramach tego projektu obejmowały ocenę terapeutycznych możliwości nowych nieimidazolowych ligandów receptora histaminowego H_3 (Zał. 4, pkt II.I.1).

Receptory histaminowe H_3 jako receptory presynaptyczne zlokalizowane są nie tylko na neuronach histaminergicznych (autoreceptory), ale także na neuronach cholinergicznych, serotoninergicznych, dopaminergicznych, noradrenergicznych i glutaminergicznych (heteroreceptory). Za ich pośrednictwem histamina może modulować uwalnianie różnych neuroprzekaźników i w ten sposób partycypować w wielu procesach fizjologicznych (np. procesy uczenia się, pamięć), jak i patologicznych. Dla przykładu (jak już wspomniano w punkcie 4.3), choroba Alzheimera związana jest z deficytem w przekaźnictwie cholinergicznym, a choroba Parkinsona – dopaminergicznym; w depresji obserwuje się zmiany w poziomie serotoniny i amin katecholowych.

Ligandy receptora H_3, pokonując barierę krew-mózg, mogą stanowić ważne środki terapeutyczne w wielu chorobach, których patogeneza wiąże się z zaburzeniami neurotransmisji w OUN.

Pomimo, że H_3R zostały wykryte w 1983 r. (grupa prof. J.-C. Schwartza z Paryża), to dopiero pod koniec 2015 r. Europejska Agencja ds. Leków (*European Medicines Agency*, EMA) zatwierdziła oficjalnie pierwszego antagonistę receptorów do leczenia narkolepsji (pitolisant, Wakix). Kolejne są w I fazie badań klinicznych: oceniane są pod kątem przydatności w leczeniu choroby Alzheimera i zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD).

Pierwsze zsyntetyzowane imidazolowe ligandy H_3R blokowały cytochrom P450 i trudno przechodziły przez barierę krew-mózg.

Testowane związki, nie zawierające w swojej strukturze pierścienia imidazolowego, zostały zaprojektowanie, zsyntezowane i wstępnie przebadane farmakologicznie *in vitro* przez zespół prof. K. Walczyńskiego z Zakładu Syntezy i Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Aktywne pochodne uzyskano drogą modyfikacji określonych układów heterocyklicznych, tj. tiazolu, benzo- i pirydynotiazolu, pirydynooksazolu, 4-hydroxypiperydyny oraz piperazyny.

Do dalszych badań wybrane zostały selektywne, wysoce aktywne, nieimidazolowe związki działające antagonistycznie na receptor H_3.

W pierwszym etapie badań oceniono ośrodkowe działanie pochodnych 4-hydroksypiperydyny1 i 5-podstawionych-2-tiazol-4-n-propylpiperazyny2, 3.

Możliwości terapeutycznego działania związków w chorobach OUN są uwarunkowane ich przechodzeniem przez barierę krew-mózg. Dlatego też sprawdzono, czy nowo zsyntetyzowane ligandy przechodzą przez barierę krew-mózg i jakie wywołują efekty w mózgu szczura po podaniu obwodowym. Badania *in vivo* obejmowały określenie wpływu ww. związków na przyjmowanie pokarmów (badania behawioralne), zbadanie ich wpływu na niektóre parametry układów aminergicznych w mózgu (stężenie amin biogennych: histaminy, dopaminy, serotoniny, noradrenaliny) oraz aktywności enzymów związanych z metabolizmem histaminy: N-metylotransferazy histaminowej (HMT) oraz MAO A i B. Wykonano także badania receptorowe (*receptor binding*).

Nowe ligandy podawano szczurom (samce szczepu Lewis) podskórnie, w dawce 3 mg/kg masy ciała, przez 5 kolejnych dni; jako związek referencyjny stosowano ciproxifan. Podczas iniekcji zwierzęta przebywały w klatkach metabolicznych, pozwalających ocenić dzienną konsumpcję paszy i wody, jak i ilość wydalanego moczu. Badanie oparte było na założeniu, że nowe związki – jako antagoniści receptora H_3 – powinny zwiększać uwalnianie histaminy, a wzrost histaminy z kolei powinien powodować spadek spożycia paszy (działanie poprzez receptory H_1).

Stwierdzono, że pochodna 4-hydroksypiperydyny przenika przez barierę krew-mózg i wywołuje spadek spożycia pokarmu, porównywalny z rezultatem uzyskanym w grupie szczurów, którym aplikowano ciproxifan (związek referencyjny).

W przypadku 5-podstawionej pochodnej 2-tiazol-4-n-propylpiperazyny analogiczne badania nie przyniosły podobnych rezultatów – podany podskórnie związek nie spowodował bowiem zmniejszenia spożycia paszy przez szczury.

Badania biochemiczne *post mortem* tkanek mózgu szczurów, którym podawano podskórnie ww. związki wykazały, że pochodna 4-hydroksypiperydyny spowodowała wzrost

stężenia histaminy w podwzgórzu, gdzie zlokalizowane są ciała neuronów histaminergicznych. Nie stwierdzono natomiast zmian w stężeniu histaminy w korze mózgowej. Analizy nie wykazały także zmian w mózgowym poziomie serotoniny i dopaminy, aczkolwiek wzrost stężenia odnotowano w przypadku noradrenaliny - jest to zgodne z wcześniejszymi danymi opisującymi hamujący wpływ wywierany przez H_3R na funkcje neuronów noradrenergicznych w korze mózgowej.

Podskórna iniekcja pochodnej 4-hydroksypiperydyny nie spowodowała żadnych zmian w aktywności HMT oraz MAO A i B.

Drugi badany ligand, 5-podstawiona pochodna 2-tiazol-4-n-propylpiperazyny, nie wywoływała znaczących zmian w stężeniu histaminy w OUN oraz w aktywności enzymów metabolizujących aminę w mózgu badanych zwierząt. Brak działania badanego związku na układ histaminergiczny nie był jednakże spowodowany brakiem jego zdolności do przekraczania bariery krew-mózg. Badany związek spowodował bowiem zmiany w stężeniach dopaminy, noradrenaliny i serotoniny. Wzrost poziomu serotoniny i noradrenaliny w mózgu (z wyjątkiem podwzgórza) wskazuje na obniżoną aktywność serotoninergiczną i noradrenergiczną oraz jednoczesny wzrost aktywności układu dopaminowego. Te odkrycia mogą sugerować, że pochodna ta prawdopodobnie wykazuje działanie agonistyczne wobec autoreceptorów serotoninergicznych, modyfikując w ten sposób uwalnianie dopaminy i noradrenaliny.

Kolejne etapy badań dotyczyły sprawdzenia działania ośrodkowego:

- *N*-benzylo-*N*-[4-(7-fenoksyheptylopiperazyn-1-ylo)butylo]guanidyny,
- *N*-4-chlorobenzylo-*N*-[4-(7-fenoksy-heptylopiperazyn-1-ylo)butylo]guanidyny,
- *N*-(4-nitrobenzylo)-*N*-[4-(7-fenoksyheptylopiperazyn-1-ylo) butylo]guanidyny.

Na podstawie uzyskanych rezultatów, stwierdzono, że oba testowane związki przechodzą przez barierę krew-mózg. Przezskórne iniekcje spowodowały u szczurów istotny statystycznie spadek spożycia paszy, w porównaniu z okresem przed wdrożeniem terapii farmakologicznej, przy czym lepszy rezultat odnotowano w przypadku *N*-4-chlorobenzylo-*N*-[4-(7-fenoksyheptylopiperazyn-1-ylo)butylo]guanidyny. W tej grupie szczurów, ograniczenie spożycia paszy było zbliżone do rezultatów uzyskanych w grupie referencyjnej, której podawano ciproxifan. Aktywne pochodne nie wpłynęły na stężenie histaminy i noradrenaliny w mózgach szczurów, przy czym obniżyły stężenie serotoniny i dopaminy (efekty te nie były związane ze zmianami aktywności MAO i HMT).

Powyższe dane zostały przedstawione w postaci 2 komunikatów na międzynarodowych konferencjach (Zał. 4, pkt III.B.6 i 8) oraz włączone do 3 prac, opublikowanych w latach 2018-2019 (Zał. 4, pkt II.A.1, II.A.3, II.A.4).

6. Syntetyczne omówienie osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych i w zakresie popularyzacji nauki[1]

Działalność dydaktyczną rozpoczęłam w 2003 r. jako wykładowca w Wyższej Szkole Turystyki i Hotelarstwa w Łodzi. Prowadziłam wykłady i ćwiczenia z zakresu fizjologii człowieka i fizjologii wysiłku fizycznego (Zał. 4, pkt III.J) dla studentów kierunku turystyka i rekreacja oraz wykłady dla seniorów w ramach Uniwersytetu Trzeciego Wieku, działającego przy Uczelni (Zał. 4, pkt III.I.3).

Od października 2006 r. do chwili obecnej prowadzę zajęcia (ćwiczenia, seminaria, wykłady) dla studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z kilku przedmiotów, na różnych kierunkach studiów ciągłych, pierwszego i drugiego stopnia (kierunek lekarski, fizjoterapia, dietetyka, kosmetologia) (Zał. 4, pkt III.J). Sprawuję także – jako promotor – opiekę naukową nad studentami realizującymi prace dyplomowe. W latach 2007-2019 pod moim kierunkiem powstało 10 prac magisterskich i 22 prace licencjackie; kolejnych 6 prac dyplomowych - w przygotowaniu (Zał. 4, pkt III.J).

Swoje kwalifikacje w zakresie nauczania dyscyplin biomedycznych podnosiłam biorąc udział w szkoleniach dydaktycznych (Zał. 4, pkt I.5-I.7).

Jako pracownik Zakładu Biochemii Hormonów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi aktywnie uczestniczyłam również w działaniach Katedry i towarzystw naukowych, prowadząc m.in. wykłady podczas zebrań naukowych (Zał. 4, pkt I.4).

Od 2008 r. jestem członkiem Zarządu Polskiego Towarzystwa Badań na Histaminą - pełnię funkcję skarbnika (Zał. 4, pkt III.H.1). W latach 1996-2018 byłam członkiem komitetów naukowych i organizacyjnych cyklicznych, odbywających się co 2 lata, międzynarodowych konferencji Towarzystwa pt. „*Biogenic Amines and Related Biologically Active Compounds*".

W 1998 r. (jako pracownik Zakładu Amin Biogennych PAN) i w 2013 r. (jako pracownik Zakładu Biochemii Hormonów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) współorganizowałam także konferencje Europejskiego Towarzystwa Badań nad Histaminą:

[1] Pełny wykaz osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych i w zakresie popularyzacji nauki przedstawiony został w *Załączniku 4.*

The 27th and 42nd Annual Meetings of the European Histamine Research Society, EHRS (Zał. 4, pkt III.C).

W 2014 r. zostałam uhonorowana, wraz z prof. W. A. Fogel, nagrodą Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia promujące Uczelnię, tj. za zorganizowanie międzynarodowej konferencji EHRS w 2013 roku (Zał. 4, pkt III.I.1).

W ramach działalności organizacyjnej angażowałam się także w promocję nauki i zdrowia na terenie Łodzi. Prowadziłam wykłady popularnonaukowe podczas trzech edycji Festiwali Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi (Zał. 4, pkt III.I.2).

Od października 2006 roku partycypuję także w bieżących zadaniach organizacyjnych mojej macierzystej placówki – Zakładu Biochemii Hormonów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Dotychczasowe badania prowadziłam we współpracy z różnymi ośrodkami naukowymi, polskimi i zagranicznymi, współrealizując 8 projektów badawczych (Zał. 4, pkt II.I) oraz prowadząc prace w ramach 3 programów europejskich: COST Action CM1103, BM0806 i D34. Obecnie Zakład Biochemii Hormonów UM partycypuje w akcji COST CA15135 (2016-2020); aktywnie uczestniczę w pracach grupy roboczej WG 2 (Zał. 4, pkt III.A).

Jestem zapraszana również do recenzowania manuskryptów kierowanych do czasopism naukowych. W latach 2013-2018 wykonałam 12 recenzji dla 6 czasopism znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (Zał. 4, pkt III.P).

Łódź, dn. 15 marca 2019 r.

A. Stańda

.....

Podpis