



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM

Autoreferat

Przedstawiający opis osiągnięć naukowych

Lucyna Pomierny-Chamioło

Katedra i Zakład Toksykologii
Wydział Farmaceutyczny UJCM

Kraków 2017

SPIS TREŚCI

1.	Informacje podstawowe	3
1.1.	Imię i nazwisko	3
1.2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
1.3.	Informacje o dotychczasowym przebiegu zatrudnienia	3
1.4.	Krótką charakterystyka dorobku naukowego	4
2.	Prezentacja osiągnięć naukowych stanowiących podstawę habilitacji	7
2.1.	Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe o którym mowa w artykule 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym.....	7
2.2.	Prezentacja wyników i streszczenie prac stanowiących podstawę habilitacji	9
2.2.1.	Wstęp do prac stanowiących postawę habilitacji	9
2.2.2.	Cel badań.....	12
2.2.3.	Wyniki badań.....	14
3.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	26
3.1.	Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.....	26
3.2.	Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	27
4.	Piśmiennictwo	29

1. Informacje podstawowe

1.1. Imię i nazwisko

Lucyna Pomierny-Chamiolo

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

✚ Doktor nauk farmaceutycznych – Katedra Farmakobiologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Kraków, dnia 18 listopada 2008 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie wybranych zmian adaptacyjnych wywołanych antagonistami metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy I”.

Promotor: Prof. dr hab. Gabriel Nowak

✚ Magister farmacji - Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Kraków, dnia 9 lipca 2001 r.

Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ leków β -adrenolitycznych na przykładzie bisoprololu na aktywność nerwowego układu autonomicznego u chorych ze stabilną dławicą piersiową.” Praca realizowana w Katedrze Patofizjologii UJCM i II Klinice Kardiologii UJCM.

Promotor: Prof. dr hab. med Piotr Thor

1.3. Informacje o dotychczasowym przebiegu zatrudnienia

✚ Październik 2010 – obecnie – adiunkt w Katedrze Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UJCM

✚ Styczeń 2010 – październik 2010 – asystent w Katedrze Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UJCM

✚ Październik 2007 – grudzień 2009 - kierownik apteki „Niezapominajka” w Krakowie

✚ Grudzień 2002 – Wrzesień 2007 - magister farmacji – asystent - w aptece „Pod Różami” w Krakowie

✚ Sierpień 2002 – listopad 2002 - magister farmacji w aptece „Salus” w Krakowie, Salus International Sp. z o.o. w Katowicach

1.4. Krótka charakterystyka dorobku naukowego

W latach 1996-2001 studiowałam na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Studia ukończyłam broniąc doświadczalną pracę magisterską pt. „Wpływ leków β -adrenolitycznych na przykładzie bisoprololu na aktywność nerwowego układu autonomicznego u chorych ze stabilną dławicą piersiową” w Katedrze Patofizjologii UJCM w Krakowie pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Piotra Thora oraz opieką Dr hab. n. med. Władysławy Kolasińskiej-Kloch. Badania kliniczne prowadzone w II Klinice Kardiologii w których wzięłam udział, a które były podstawą mojej pracy magisterskiej, obudziły we mnie chęć dalszej pracy naukowej.

Po ukończeniu stażu zawodowego w aptece i rozpoczęciu pracy zawodowej w zawodzie aptekarza postanowiłam kontynuować rozwój naukowy na studiach doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym UJCM, które rozpoczęłam w roku 2003 pod kierownictwem Prof. dr hab. Gabriela Nowaka. Moje zainteresowania naukowe w dalszym ciągu związane były z układem nerwowym, a skupiły się na badaniu układu glutaminianergicznego. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w zakresie farmakologii uzyskałam w 2008 roku po obronie pracy doktorskiej pt. „Badanie wybranych zmian adaptacyjnych wywołanych antagonistami metabotropowych receptorów glutaminianergicznym grupy I”. Na tym etapie mój łączny dorobek naukowy obejmował współautorstwo 3 oryginalnych prac naukowych, o łącznym współczynniku **IF = 2.475** oraz 13 doniesień zjazdowych.

W styczniu 2010 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Toksykologii UJCM, a w październiku otrzymałam etat adiunkta tejże Katedry, na którym pracuję do dnia dzisiejszego. Główny temat badawczy którym zajęłam się w Katedrze Toksykologii dotyczył badania roli układu glutaminianergicznego w powstawaniu zaburzeń neuropsychiatrycznych, ze szczególnym uwzględnieniem uzależnień. W roku 2011 ze środków Narodowego Centrum Nauki uzyskałam finansowanie badań nad projektem pt. „Charakterystyka wybranych receptorów glutaminianergicznym (jono- i metabotropowych) w mechanizmie uzależnienia od kokainy”, którego byłam kierownikiem. Jego realizację zakończyłam w 2015 roku. Wyniki tych badań

stały się przedmiotem prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. W tym samym okresie byłam również wykonawcą w innym projekcie grantowym pt. „Rola układu endokannabinoidowego w patogenezie depresji i w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych” pod kierownictwem Prof. dr hab. Małgorzaty Filip. W roku 2011 podjęłam współpracę z Pracownią Farmakologii Uzależnień Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie czego efektem była realizacja od 2012 roku projektu grantowego pt. "Rola receptorowych kompleksów heterodimerskich mGluR5-D2 w wygaszaniu zachowań poszukiwawczych związanych z uzależnieniem od substancji psychostymulujących (kokaina i MDMA): analiza behawioralna i biomolekularna u szczurów" pod kierownictwem Dr Małgorzaty Frankowskiej, w którym pełniłam funkcję wykonawcy. Współpracowałam również z Zakładem Biochemii Toksykologicznej UJCM, biorąc udział w badaniach nad projektem Prof. dr hab. Bogusławy Budziszewskiej nad neurotoksycznym działaniem eterów glikolu etylowego oraz Katedrą Chemii Organicznej UJCM w badaniach nad poszukiwaniem nowych ligandów receptorów endokannabinoidowych CB1 i CB2. Wspólnie z Prof. dr hab. Gabrielem Nowakiem brałam udział w projekcie dotyczącym roli metabotropowych receptorów glutaminianergicznych mGluR5 w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Od 2015 roku podjęłam kolejny temat badawczy również związany z badaniem układu glutaminianergicznego. Dotyczy on wpływu diety matki w okresie ciąży i karmienia na podatność na choroby neuropsychiatryczne u potomstwa. W 2016 roku uzyskałam z Narodowego Centrum Nauki finansowanie kolejnego projektu grantowego pt. „Wpływ diety wysokotłuszczowej i wysokocukrowej matki na powstawanie zaburzeń w budowie receptorów NMDA potomstwa oraz regulacji ich aktywności w kontekście zaburzeń pamięci”, którego jestem kierownikiem. Jestem również kierownikiem projektu statutowego finansowanego ze środków UJCM pt. „Zmiany w poziomie neuropeptydów i ekspresji ich receptorów w strukturach mózgowych potomstwa matek karmionych dieta wysokotłuszczowa i wysokocukrowa w okresie ciąży”.

Aktualnie mój dorobek naukowy obejmuje 55 pozycji. Składa się na niego 17 pełnotekstowych publikacji oryginalnych w anglojęzycznych, recenzowanych czasopismach naukowych, posiadających *impact factor*, w tym dwie anglojęzyczne prace przeglądowe w impaktowanych czasopismach oraz

2 rozdziały w anglojęzycznych monografiach wydanych przez wydawnictwo Springer, a także 36 doniesień konferencyjnych, w tym 18 opublikowanych w suplementach do czasopism posiadających *impact factor*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania *impact factor* publikacji recenzowanych wynosi **IF = 60.068** co odpowiada punktacji **MNiSW = 437**. Całkowita liczba cytowań wynosi **297**, a index Hirsha **h = 8**.

2. Prezentacja osiągnięć naukowych stanowiących podstawę habilitacji

Przedmiotem przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest **monotematyczny cykl 5 publikacji (P-1 – P-5)** zatytułowany: „**Zmiany neuroadaptacyjne układu glutaminianergicznego i stan oksydo-redukcyjny w rozwoju uzależnienia od kokainy**”. Obejmuje on 1 pracę pogładową oraz 4 pełnotekstowe prace oryginalne, opublikowane w anglojęzycznych recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Zgodnie z analizą bibliometryczną, łączny współczynnik *impact factor* cyklu publikacji wynosi **IF = 20.826**, a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to **145 pkt**. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

2.1. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe o którym mowa w artykule 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym

P-1 - Pomierny-Chamiolo L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M. „Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction”. *Pharmacology & Therapeutics* 2014 Jun;142(3):281-305
(Elsevier; **IF₂₀₁₄ = 9.723**; MNiSW₂₀₁₄ = 45 pkt)

P-2 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkziel J, Frankowska M, Bystrowska B, Filip M. “Cocaine self-administration, extinction training and drug-induced relapse change metabotropic glutamate mGlu5 receptors expression: evidence from radioligand binding and immunohistochemistry assays”. *Brain Research* 2017 Jan 15;1655:66-76
(Elsevier; **IF₂₀₁₅ = 2.561**; MNiSW₂₀₁₅ = 25 pkt)

P-3 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkziel J, Frankowska M, Mizera J, Filip M. “Neuroadaptive changes in metabotropic glutamate mGlu2/3R expression during different phases of cocaine addiction in rats”. *Pharmacological Reports* 2017 (w druku) doi: 10.1016/j.pharep.2017.04.016
(Elsevier; **IF₂₀₁₅ = 2.251**; MNiSW₂₀₁₅ = 25 pkt)

P-4 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkiel J, Frankowska M, Pomierny B, Niedzielska E, Smaga I, Fumagalli F, Filip M. „Withdrawal from cocaine self-administration and yoked cocaine delivery dysregulates glutamatergic mGlu5 and NMDA receptors in the rat brain”. *Neurotoxicity Research* 2015 Apr;27(3):246-258
(Springer; **IF₂₀₁₅ = 3.140**; MNiSW₂₀₁₅ = 25 pkt)

P-5 - Pomierny-Chamiolo L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M. “Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine”. *Neurotoxicity Research* 2013 Jan;23(1):92-102
(Springer; **IF₂₀₁₃ = 3.151**; MNiSW₂₀₁₅ = 25 pkt)

2.2. Prezentacja wyników i streszczenie prac stanowiących podstawę habilitacji

2.2.1. Wstęp do prac stanowiących podstawę habilitacji

Raport Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (ECMDDA) z 2016 roku donosi, iż spożycie substancji uzależniających, a zwłaszcza psychostymulujących, w krajach Unii Europejskiej ciągle rośnie, natomiast kokaina jest najczęściej stosowaną, nielegalną substancją psychostymulującą w Europie. Uzależnienia wywołane przez psychostymulanty stanowią poważny problem medyczny i społeczny, dotyczący w coraz większym stopniu także Polskę.

Kokaina wykazuje działanie zarówno na ośrodkowy jak i obwodowy układ nerwowy. Działając na obwodzie pobudza zakończenia nerwów współczulnych powodując m. in. silny skurcz naczyń krwionośnych ze wzrostem ciśnienia tętniczego, rozszerzenie źrenic, rozkurcz mięśni oskrzelowych, zahamowanie perystaltyki przewodu pokarmowego oraz hamowanie aktywności gruczołów ślinowych.

Wpływ na ośrodkowy układ nerwowy człowieka zależy od podanej dawki. Podanie niskiej dawki powoduje euforię, pobudzenie psychoruchowe oraz opóźnia objawy zmęczenia. Większe dawki wywołują tzw. "cocaine high" objawiający się euforią, gadatliwością, ekscytacją i samozadowoleniem. Występować mogą zachowania agresywne, brak krytycyzmu do własnych możliwości i zachowań, niepokój i napięcie, bezsenność, nasilenie doznań czuciowych, obniżenie potrzeby odżywiania się i snu. Bardzo wysokie dawki z kolei zaburzają pamięć, myślenie i osądy, wywołują wzrost aktywności ruchowej, a także lęk, niepokój, urojenia o nieprzyjemnej treści, omamy wizualne i słuchowe, często depresję i poczucie bezradności prowadzące do samobójstwa. Ważny jest również fakt, że u niektórych osób, nawet jednorazowe podanie narkotyku może skutkować napadem drgawek oraz gwałtownym wzrostem ciśnienia, zaburzeniami funkcji ośrodków oddechowego i sercowo-naczyniowego prowadzącymi do śmierci (Filip i Przegalinski, 2005)[35]. Działanie euforyczne kokainy jest powodem dla którego ludzie po nią sięgają. Wielokrotnie stosowana powoduje uzależnienie psychiczne, czyli przymus jej poszukiwania i przyjmowania dla uzyskania efektu euforycznego (seeking behavior) i uniknięcia emocjonalnego dyskomfortu spowodowanego

odstawieniem (withdrawal). Głównymi symptomami odstawienia kokainy jest głód narkotykowy, czyli chęć zdobycia narkotyku za wszelką cenę oraz objawy subiektywne jak lęk, dysforia, anhedonia. Objawy odstawienia (cocaine crash) trwają od kilku godzin do kilku dni i związane są z niedoborem neuroprzekaźnika w synapsie. Prowadzi to do wystąpienia depresji, poczucia zmęczenia i zwiększenia ilości przyjmowanych pokarmów. Długotrwały brak dostępu do kokainy (kilka tygodni, czy miesięcy) skutkuje objawami wtórnymi jak: zmienność nastroju, anhedonia, lęk, osłabienie pamięci i koncentracji (Filip i Przegalinski, 2005)[35].

Podstawową cechą uzależnienia jest utrata kontroli nad zachowaniem, manifestująca się niekontrolowanym popędem przyjmowania substancji uzależniających („głód narkotykowy”, craving) i/lub niekontrolowanym nawrotem do ich stosowania nawet po długim okresie abstynencji (Kalivas i Volkow, 2005)[1]. Pomimo wielu lat i dużych nakładów finansowych mechanizm powstawania uzależnienia od kokainy nie został w pełni poznany, a współczesne metody terapii nie spełniają oczekiwań pacjentów ani lekarzy. Powodem takiego stanu rzeczy jest złożony mechanizm działania długotrwale stosowanej kokainy. Dotychczasowe przedkliniczne i kliniczne dane literaturowe jednoznacznie wskazują na fakt, że w efekty nagradzające kokainy zaangażowany jest dopaminergiczny system neuroprzekaźnikowy mózgu, a układy serotonergiczny i noradrenergiczny modulują powyższą aktywność dopaminową. Obserwowane jest nagromadzenie neuroprzekaźników w przestrzeni synaptycznej, szczególnie w obrębie szlaku mezolimbicznego (jądro półleżące przegrody) co przedłuża i wzmacnia działanie kokainy przez odpowiednie receptory. Natomiast w nawrocie zachowań poszukiwawczych po okresie abstynencji poprzedzonym długotrwałym nadużywaniem kokainy kluczową rolę odgrywa nie tylko układ dopaminowy, ale także glutaminianergiczny (Kalivas i Volkow, 2005)[1]. Zachwianie równowagi w tym układzie obserwowane w uzależnieniu kokainowym wywołuje zaburzenia w neurotransmisji i plastyczności synaptycznej (Cleva i wsp. 2011)[2] co wydaje się być podstawą zmian w fizjologii mózgu oraz przyczyniać się może do dysfunkcji emocjonalnej, zaburzeń pamięci, uczenia się, motywacji i samokontroli. W badaniach funkcjonalnych obserwuje się osłabienie komunikacji pomiędzy korą przedczołową i jądrem półleżącym przegrody (Kalivas i Volkow, 2005)[1]. W powyższe zaburzenia wydają się być zaangażowane, zgodnie z danymi

literaturowymi, glutaminergiczne receptory zarówno jonotropowe jak i metabotropowe. Badania nad uzależnieniem kokainowym w ciągu ostatnich lat skupiły się właśnie na układzie glutaminianergicznym.

Układ glutaminianergiczny odznacza się dużą różnorodnością w budowie i funkcji receptorów. Neurotransmitterem pobudzającym w układzie glutaminianergicznym jest głównie kwas glutaminowy, który występuje w ponad 50% komórek nerwowych ludzkiego mózgu. Prawdopodobnie również każda komórka nerwowa posiada receptory wrażliwe na działanie tego neuroprzekaźnika. Układ glutaminianergiczny zaangażowany jest w procesy uczenia się, zapamiętywania i konsolidacji śladów pamięciowych, neuroplastyczności, ale również neurotoksyczności. Odgrywa również istotną rolę w wielu patologicznych stanach ośrodkowego układu nerwowego. Aktywacja receptorów układu glutaminianergicznego może wywołać silne pobudzenie komórek nerwowych, doprowadzić do neurodegeneracji oraz śmierci neuronu. Wśród receptorów tego układu wyróżniamy receptory jonotropowe (NMDA, AMPA, kainowe) odpowiadające za szybką transmisję synaptyczną oraz pełniące funkcję regulatorową receptory metabotropowe (Grupy I, II i III). Ja w swojej pracy skupiłam się na receptorach NMDA oraz metabotropowych receptorach grupy I i II.

Badania ostatnich lat dostarczyły pewnych dowodów na udział układu glutaminianergicznego w uzależnieniu kokainowym. Co więcej, ligandy receptorów glutaminianergicznych hamują efekty behawioralne kokainy u zwierząt laboratoryjnych (Kenny i wsp., 2005, Peters i Kalivas, 2006)[3, 4]. Ponadto mGluR odgrywają istotną rolę w mediowaniu działania zewnątrzkomórkowego glutaminianu uwolnionego podaniem kokainy (Kenny i wsp. 2005)[3].

W badaniach nad uzależnieniami wykorzystywane są różnorodne zwierzęce modele doświadczalne oparte na symptomach nadużywania lub uzależnienia (pobudzenie psychoruchowe, efekty subiektywne, efekty nagradzające / wzmacniające, nawroty), diagnostycznych kryteriach uzależnienia (kompulsywne przyjmowanie substancji, głód narkotykowy) bądź też na analizie różnych źródeł wzmocnienia (substancja uzależniająca, bodźce warunkowe związane z jej przyjmowaniem, stres). Należy podkreślić, że nie ma jednego modelu zwierzęcego który odzwierciedlałby całość złożonej symptomatologii uzależnienia od kokainy i innych substancji uzależniających. Kokaina podawana gryzoniom w niskich dawkach wywołuje wzrost aktywności lokomotorycznej (Przegalinski i Filip,

1997)[5], w średnich dawkach stereotypie, a w wyższych stany drgawkowe (McCreary i Marsden, 1993)[6]. Przyjmuje się, że zwiększona przez kokainę aktywność lokomotoryczna u zwierząt obrazuje pobudzenie psychoruchowe pod wpływem tej substancji u ludzi. U ludzi uzależnionych od kokainy, sensytyzacja ujawnia się w postaci psychoz paranoidalnych. Kokaina wywołuje również tzw. dodatnie wzmocnienie w modelach zachowań instrumentalnych, np. może być samopodawana. Samopodawanie (self-administration), stanowi symulację zjawiska nadużywania środków uzależniających przez ludzi i służy do oceny potencjału uzależniającego oraz nagradzających właściwości tych środków. W modelu tym, nagradzana jest reakcja zwierzęcia (np. reakcja instrumentalna - naciskanie na dźwignie) prowadząca do uzyskania porcji narkotyku. Procedury wygaszania i nawrotów u zwierząt trenowanych do samopodawania kokainy służą ponadto do badania głodu narkotycznego i nawrotów wywołanych wielokrotną ekspozycją na kokainę.

We wszystkich badaniach wykonanych w projekcie, których opublikowanie stanowi podstawę habilitacji, do oceny działania nagradzającego kokainy, wygaszania oraz nawrotu zachowań poszukiwawczych wykorzystano uznany w świecie nauki model dożylnego samopodawania kokainy u szczurów, odwzorowujący poszczególne fazy rozwoju uzależnienia (Scofield i wsp., 2016)[7]. Zastosowano ponadto procedurę sprzężenia „yoked” mającą na celu wygenerowanie odpowiednich grup kontrolnych zwierząt. Procedura ta umożliwia oddzielenie efektów związanych z aktywnym pobieraniem kokainy od efektów farmakologicznych kokainy (czynne i bierne pobieranie kokainy).

2.2.2. Cel badań

Pomimo, że dopamina pełni podstawową rolę w działaniu kokainy, dotychczasowe próby zastosowania ligandów tego układu w leczeniu uzależnienia od kokainy okazały się mało przydatne (Preti, 2007)[8]. Stosowane związki tego typu, obok małej skuteczności klinicznej posiadają też niekorzystne i ograniczające ich zastosowanie efekty uboczne (Preti, 2007)[8]. I choć w dalszym ciągu trwają poszukiwania substancji leczniczych działających w obrębie układu dopaminowego jak np. wprowadzenie terapii zastępczej, czyli wprowadzenie inhibitora wychwyty zwrotnego dopaminy np. mazindolu, lub substancji działających bezpośrednio na receptory dopaminowe np. receptory D3 (agonista

BP897), D1/2 (agonista bromokryptyna) albo inne np. selegelina (inhibitor monoaminooksygenazy typu B), disulfiram (min. inhibitor -oksygenazy), obecne strategie badawcze koncentruje się na innych niż dopamina neuroprzekaźnikach ośrodkowego układu nerwowego, w tym kwasie glutaminowym, który reguluje neurochemiczne i behawioralne efekty kokainy. Z interwencją w ten układ wiąże się nadzieje na nowe, bardziej skuteczne metody terapii uzależnienia kokainowego. Większość badań koncentruje się na behawioralnych aspektach zastosowania ligandów receptorów dla kwasu glutaminowego w uzależnieniu od kokainy. Brak kompleksowych analiz molekularnych dotyczących zmian w obrębie receptorów kwasu glutaminowego oraz roli stresu oksydacyjnego, związanego nie tylko z toksycznym działaniem kokainy, ale także wzmożoną ilością neuroprzekaźników w przestrzeni synaptycznej i okołosynaptycznej w poszczególnych fazach uzależnienia od kokainy stał się przyczyną do podjęcia tego tematu.

Celem prac przedstawionych w punkcie 2.1. tego autoreferatu była:

- ✚ Szczegółowa analiza literatury dotyczącej badań nad metabotropowymi receptorami glutaminergicznymi i zastosowaniem ich ligandów w uzależnieniach.
- ✚ Molekularna ocena gęstości i wrażliwości oraz ekspresji białkowej receptorów mGluR5 z grupy I metabotropowych receptorów glutaminianergicznych w strukturach mózgowych w poszczególnych fazach uzależnienia w modelu samopodawania kokainy u szczurów.
- ✚ Molekularna ocena gęstości i wrażliwości oraz ekspresji białkowej receptorów mGluR2/3 z grupy II metabotropowych receptorów glutaminianergicznych w strukturach mózgowych w poszczególnych fazach uzależnienia w modelu samopodawania kokainy u szczurów.
- ✚ Ocena ekspresji podjednostek receptora jonotropowego NMDA oraz wybranych jego białek rusztowania w strukturach mózgowych w

poszczególnych fazach uzależnienia w modelu samopodawania kokainy u szczurów.

- ✚ Analiza markerów stresu oksydacyjnego w strukturach mózgowych i narządach obwodowych jako czynnika rozwoju uzależnienia od kokainy w modelu samopodawania kokainy u szczurów.

2.2.3. Wyniki badań

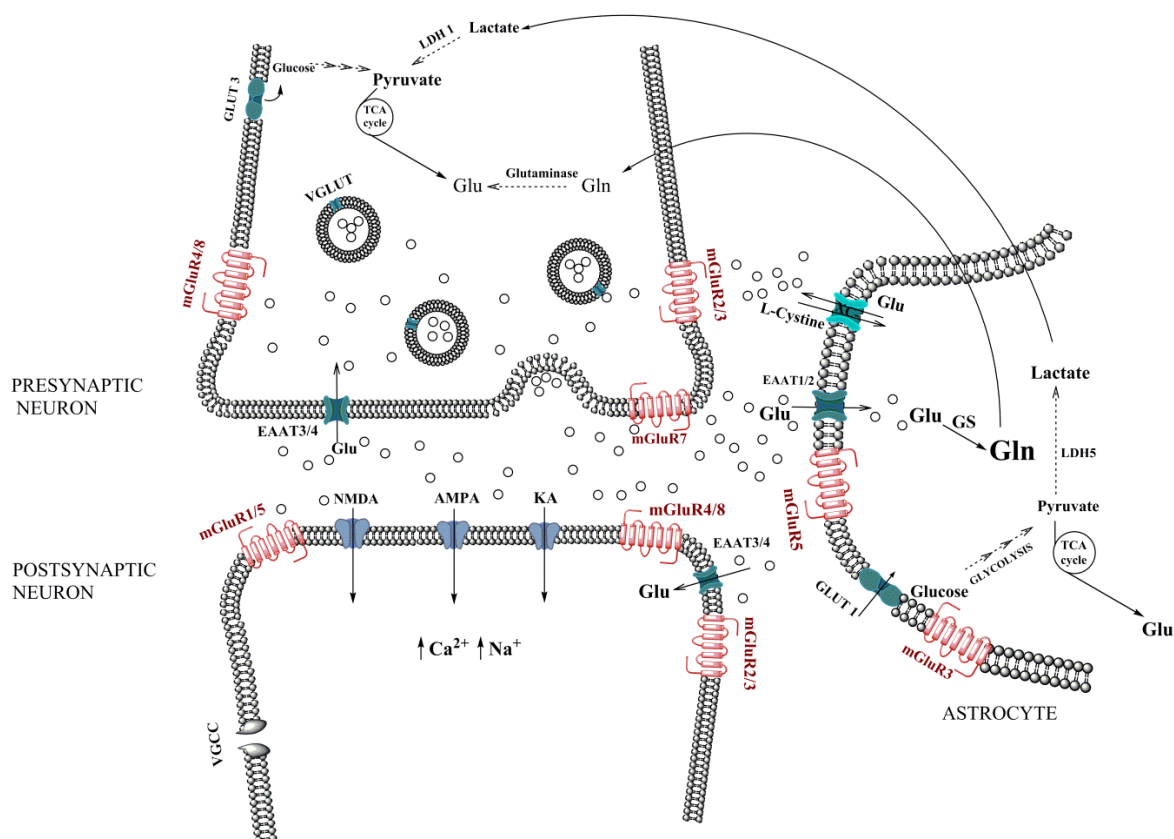
P-1 - Pomierny-Chamiolo L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M. „Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction”. *Pharmacology & Therapeutics* 2014 Jun;142(3):281-305 (Elsevier; **IF**₂₀₁₄ = **9.723**; MNiSW₂₀₁₄ = 45 pkt)

W przedstawionej pracy poglądowej dokonano obszernej analizy światowej literatury (łącznie 398 pozycji) dotyczącej badań nad metabotropowymi receptorami glutaminergicznymi i ich ligandami w uzależnieniach od psychostymulantów, opiatów, nikotyny oraz alkoholu. We wstępie zarysowano problem badawczy oraz dokonano analizy neurotransmisji glutaminergicznej.

Glutaminianergiczna homeostaza w ośrodkowym układzie nerwowym jest utrzymywana dzięki prawidłowemu funkcjonowaniu szeregu elementów takich jak receptory jono- i metabotropowe, transportery dla kwasu glutaminowego i glukozy, antyportera cysteina/glutaminian oraz cyklu metabolizmu glutamianinu. Lokalizację receptorów glutaminianergicznych w mózgowej synapsie oraz homeostazę glutamianinu schematycznie przedstawiono na rysunku 1.

Glutaminianergiczne receptory metabotropowe stanowią grupę ośmiu podtypów receptorów dla kwasu glutaminowego podzielonych zgodnie z homologią sekwencji aminokwasów oraz rodzajem szlaku przekazywania sygnału w komórce na trzy grupy (grupa I obejmująca receptory mGluR1 i mGluR5, grupa II obejmująca receptory mGluR3 i mGluR3 oraz grupa III obejmująca receptory mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8). Zbudowane są z 7 transbłonowych domen hydrofobowych połączonych fragmentami hydrofilowymi tworzącymi pętle zewnętrzne i wewnętrznekomórkowe. i należą do rodziny receptorów związanych z białkiem G. Tworzą one homo- i heterodimery, co warunkuje pobudliwość receptora. Fizjologiczna rola tych receptorów jest bardzo rozległa i w dużej mierze zależna od lokalizacji w mózgu. Sprowadza się do modulowania kanałów

jonowych i pobudliwości komórkowej, kontroli transmisji synaptycznej, oraz kontroli i regulacji uwalniania neurotransmiterów.



Rysunek 1. Synaptyczna lokalizacja metabotropowych receptorów glutaminianergicznego (mGluR) w synapsach mózgowych oraz homeostaza kwasu glutaminowego (**P-1**).

W pracy (**P-1**) szczegółowo opisano strukturę, rozmieszczenie oraz fizjologiczne efekty pobudzenia wszystkich ośmiu rodzajów receptorów (mGluR1 – mGluR8). Dla każdego z nich scharakteryzowano także lokalizację genową, efekty farmakologicznej modulacji oraz dotychczasową wiedzę na temat znaczenia w różnych typach uzależnień (psychostymulanty, opiaty, nikotyna oraz alkohol).

W tabeli 1 prezentowanej pracy dokonano dla wszystkich receptorów mGluR zestawienia obejmującego główny szlak sygnałowy, ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym u różnych gatunków ssaków oraz charakterystykę fenotypu zwierząt genetycznie pozbawionych określonego typu receptora.

Na uwagę zasługują tabele 2-4, w których zestawiono związki będące agonistami, pozytywnymi allosterycznymi modulatorami, kompetycyjnymi

antagonistami oraz negatywnymi allosterycznymi modulatorami dla receptorów mGluR1-8. Dla każdego z tych związków podano literaturowe wartości K_i /IC₅₀/EC₅₀. W kolejnej części pracy (tabela 5) scharakteryzowano te związki, które badane były w różnych modelach uzależnienia.

Podsumowanie i wnioski: Chociaż kliniczne poszukiwania aktywności ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych skupione są bardziej na innych chorobach neuropsychiatrycznych, takich jak lęk czy depresja, to znaczna ekspresja tych receptorów w rejonach mózgu związanych z układem nagrody, odpowiedzialnych za zachowania poszukiwacze, uzasadnia próby zastosowania tych związków w badaniach nad uzależnieniami. Badania ostatnich lat wskazują na znaczną rolę receptorów mGluR1, mGluR2/3, mGluR5 oraz mGluR7 w kontrolowaniu mechanizmów nawrotu do przyjmowania substancji uzależniających.

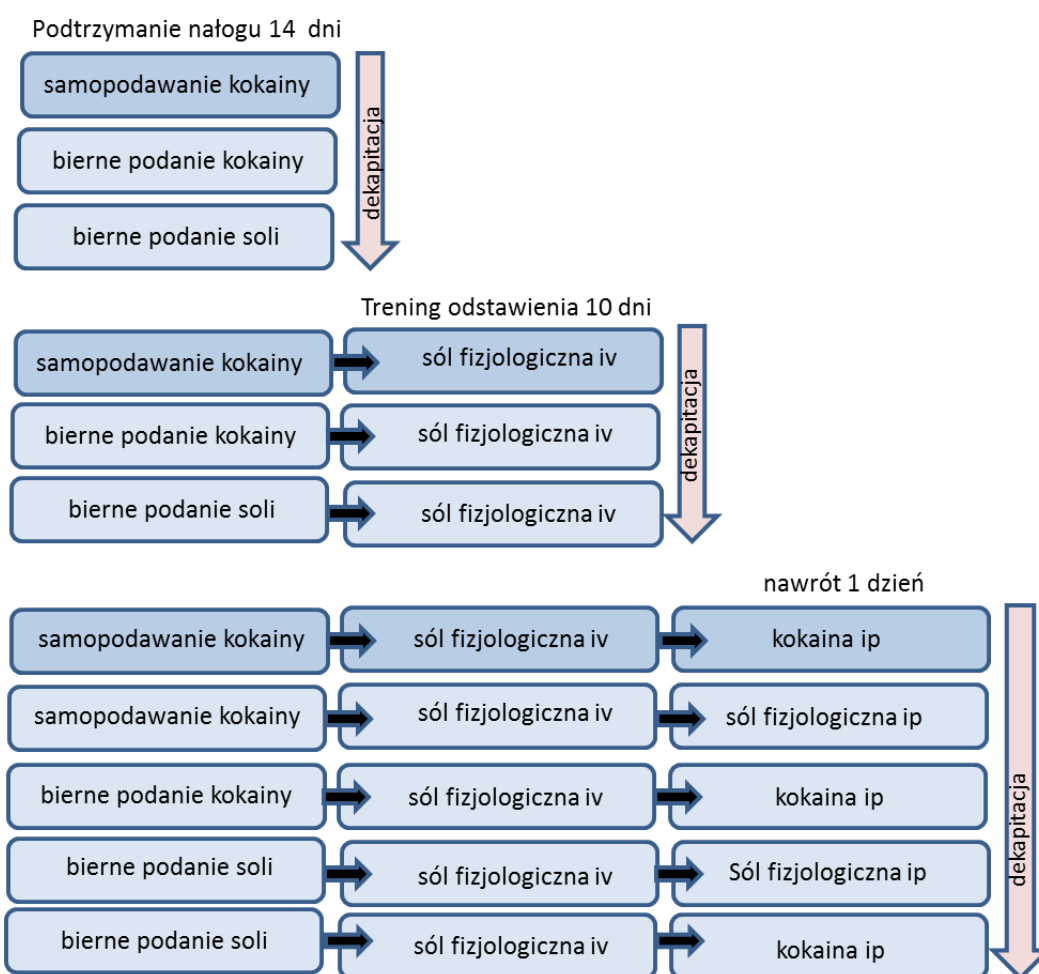
P-2 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkiel J, Frankowska M, Bystrowska B, Filip M. "Cocaine self-administration, extinction training and drug-induced relapse change metabotropic glutamate mGlu5 receptors expression: evidence from radioligand binding and immunohistochemistry assays". *Brain Research* 2017 Jan 15;1655:66-76.

(Elsevier; **IF**₂₀₁₅ = **2.561**; MNiSW ₂₀₁₅ = 25 pkt)

Badania przedkliniczne wykazały, że zwierzęta genetycznie pozbawione receptorów mGluR5 trudniej wchodzą w procedurę uzależnienia od kokainy oraz nie wykazują zwiększonej aktywności indukowanej kokainą (Chiamulera i wsp. 2001)[9]. Z kolei farmakologiczne zablokowanie tych receptorów w mózgu hamuje pobieranie kokainy przez już uzależnione zwierzęta (Kenny i wsp. 2005)[3] oraz poszukiwanie kokainy indukowane kontekstem (Backstrom i Hyytia, 2006)[10]. Te przesłanki były podstawą do zbadania receptorów mGluR5 jako ważnego punktu uchwytu w mechanizmie powstawania uzależnienia.

W prezentowanej pracy opublikowano wyniki radioizotopowej saturacyjnej analizy gęstości receptorów mGluR5 oraz ich ekspresji białkowej w strukturach mózgowych szczurów w modelu dożylnego samopodawania kokainy. Do analizy wybrano rejony mózgu zaangażowane w proces rozwoju uzależnienia i nawrotu do nałogu: korę przedczołową (PFCx), będącą miejscem kontroli decyzji i

działania, jądro półleżące przegrody (NAc), uznawane za ośrodek nagrody, grzbietowe prążkowie (DST), miejsce powstawania zachowań nawykowych, oraz hipokamp (HIP) odpowiedzialny za pamięć i uczenie się. W celu wykonania analiz w kolejnych fazach uzależnienia zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy. Pierwsza grupa została poddana eutanazji po 14-tej sesji samopodawania kokainy, druga po etapie dwu-tygodniowego samopodawania została poddana 10-dniowemu treningowi odstawienia, natomiast trzecia po etapie odstawienia została wprowadzona do kolejnej fazy: nawrotu indukowanego podaniem wywołującej dawki kokainy (10 mg/kg, *ip*). Schematycznie podział na grupy w każdej fazie uzależnienia przedstawiono poniżej na rysunku 2.



Rysunek 2. Projekt eksperymentu (P-2)

Przebieg eksperymentów behawioralnych w poszczególnych fazach uzależnienia opisano szczegółowo w części metodycznej pracy.

Do zbadania gęstości receptorów we frakcji błonowej wykorzystano metodę analizy radioreceptorowej z zastosowaniem znakowanego trytem negatywnego

allosterycznego modulatora receptorów mGluR5, związku [³H]MPEP (**P-2**). Ekspresję białkową receptorów zbadano przy zastosowaniu metody Western blot (**P-4**). W celu oceny lokalizacji strukturalnej receptorów mGluR5 wykonano analizę immunohistochemiczną wykonując immunofluorescencyjne znakowanie skrawków po wcześniejszej perfuzji paraformaldehydem (**P-2**).

Zarówno aktywne pobieranie jak i bierne podawanie kokainy spowodowały u zwierząt doświadczalnych istotny statystycznie wzrost gęstości receptorów (wartość B_{max}) mGluR5 w grzbietowym prążkowie, nie stwierdzono natomiast zmian w powinowactwie liganda do receptorów (wartość K_d) (Rysunek 2 prezentowanej pracy **P-2**). Metoda Western blot potwierdziła powyższe wyniki wykazując wzmożoną ekspresję białka receptorowego mGluR5 (Rysunek 5 w pracy **P-4**). Analiza immunohistochemiczna wykazała ponadto znamiennej wzrost ekspresji białkowej mGluR5 w istocie czarnej, a spadek w skorupie jądra półleżącego przegrody (Rysunek 2 prezentowanej pracy **P-2**).

Rezultatem dwugodzinnego, powtarzanego przez 10 dni treningu odstawienia od kokainy szczurów w klatkach doświadczalnych były dwufazowe zmiany na szlaku kora przedczołowa - jądro półleżące przegrody. Odnotowano istotny spadek gęstości receptorów w korze przedczołowej oraz istotny wzrost w jądrze półleżącym przegrody. Podobnie jak w fazie podtrzymania nałogu w fazie odstawienia opisane zmiany powstały zarówno w grupie aktywnie jak i biernie otrzymującej kokainę. Ponadto zaobserwowano również, że wzmożona gęstość receptorów mGluR5 w fazie podtrzymania nałogu w grzbietowym prążkowie utrzymała się tylko u zwierząt biernie otrzymujących kokainę w pierwszej fazie, natomiast trening odstawienia spowodował obniżenie wartości B_{max} w prążkowie zwierząt aktywnie pobierających kokainę. W fazie odstawienia zaobserwowano także istotny wzrost gęstości receptorów mGluR5 tylko w hipokampie zwierząt aktywnie pobierających kokainę w pierwszej fazie uzależnienia. W żadnej ze struktur nie zaobserwowano istotnych zmian w powinowactwie [³H]MPEP do receptorów (Rysunek 3 prezentowanej pracy **P-2**).

Jednorazowe podanie dootrzewnowe wywołującej dawki kokainy, ale nie soli fizjologicznej, po 10 dniowym okresie treningu odstawienia spowodowało nawrót zachowań poszukiwawczych w grupie aktywnie pobierającej kokainę podczas pierwszej fazy, natomiast w badaniach radioreceptorowych spadek gęstości receptorów mGluR5 w jądrze półleżącym przegrody oraz hipokampie.

Ponadto w hipokampie down-regulacji towarzyszył wzrost powinowactwa liganda [³H]MPEP do receptorów. W pozostałych grupach kontrolnych nie zaobserwowano istotnych zmian. Analiza immunohistochemiczna potwierdziła wzmożoną ekspresję receptorów we wszystkich ocenianych rejonach kory przedczołowej oraz spadek ich ekspresji w hipokampie (Rysunek 4 prezentowanej pracy **P-2**).

Wnioski: Przedstawione w pracy wyniki pokazują, że zarówno w fazie podtrzymania uzależnienia od kokainy, jej odstawienia jak i indukowanego kokainą nawrotu dochodzi do szeregu zaburzeń w gęstości receptorów mGluR5 oraz powinowactwa liganda do tych receptorów w strukturach mózgowych szczura. Obserwowane zmiany wydają się być specyficzne dla struktur mózgowych, zależne od sposobu podania kokainy i związane zarówno z właściwościami farmakologicznymi jak i motywacyjnymi kokainy.

P-3 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkiel J, Frankowska M, Mizera J, Filip M. "Neuroadaptive changes in metabotropic glutamate mGlu2/3R expression during different phases of cocaine addiction in rats". *Pharmacological Reports* 2017 (praca w druku) doi: 10.1016/j.pharep.2017.04.016 (Elsevier; **IF₂₀₁₅ = 2.251**; MNiSW ₂₀₁₅ = 25 pkt)

W kolejnej pracy pochyłono się nad zmianami w obrębie receptorów glutamianianergicznych metabotropowych grupy II (mGluR2 i mGluR3) powstającymi pod wpływem podawania zwierzętom kokainy w sposób aktywny lub bierny. Zagadnienie to podjęto, gdyż w przedklinicznych badaniach behawioralnych zaobserwowano, iż podanie agonistów receptorów mGluR2/3 hamuje nawrót zachowań poszukiwawczych indukowany kontekstem lub podaniem kokainy, metamfetaminy, heroiny czy nikotyny (Baptista i wsp., 2004; Adewale i wsp. 2006; Peters i Kalivas, 2006; Bauzo i wsp., 2009; Lu i wsp., 2012; Justinova i wsp., 2016)[11, 12, 4, 13, 14, 15]. Inne obserwacje dotyczyły wzmożonej odpowiedzi behawioralnej oraz uwalniania dopaminy i glutamianianu u zwierząt genetycznie pozbawionych receptorów mGluR2 po podaniu kokainy (Morishima, 2005)[16].

W prezentowanej pracy zastosowano ten sam model samopodawania kokainy który opisano w publikacji **P-2**. Analizie poddano gęstość receptorów mGluR2/3 we frakcji membranowej, wykorzystując radioreceptorową metodę

saturacyjną przy użyciu znakowanego kompetycyjnego antagonisty tych receptorów, związku [³H]LY341495. Dokonano również oceny powinowactwa liganda do receptorów, a także wykonano analizę ekspresji białkowej receptorów mGluR2/3 w homogenacie tkankowym metodą Western blot. Eksperymenty przeprowadzono (jak w poprzedniej prezentowanej pracy **P-2**) na czterech strukturach mózgowych: korze przedczołowej, jądrze półleżącym przegrody, grzbietowym prążkowie oraz hipokampie w trzech fazach uzależnienia: fazie podtrzymania nałogu, fazie odstawienia oraz fazie nawrotu indukowanego jednorazowym dootrzewnym podaniem dawki kokainy.

Chronicznie podawana kokaina, zarówno w sposób bierny jak i zależny od woli zwierzęcia, spowodowała znamienne wzrost gęstości receptorów mGluR2/3 w korze przedczołowej oraz grzbietowym prążkowie. Ponadto stwierdzono istotne obniżenie wartości K_d dla użytego liganda, w korze przedczołowej, ale tylko u zwierząt aktywnie pobierających kokainę, co sugeruje wzrost powinowactwa liganda do receptorów. W badaniu ekspresji białkowej stwierdzono wzrost w ilości monomerów w grzbietowym prążkowie oraz analogiczną tendencję w ilości dimerów (Rysunek 2 prezentowanej pracy **P-3**). Obie struktury, zarówno kora przedczołowa jak i grzbietowe prążkowie odgrywają kluczową rolę w pierwszym etapie rozwoju uzależnienia i uczenia się nowych zachowań, a glutaminianergiczna projekcja z kory przedczołowej do prążkowie moduluje ten proces uczenia (Lovinger i wsp., 2010)[17].

Efektom dziesięciodniowego treningu odstawienia od kokainy lub abstynencji była znamienna down-regulacja gęstości receptorów mGluR2/3 w korze przedczołowej oraz jądrze półleżącym przegrody. Stwierdzono również znamienne spadki powinowactwa liganda [³H]LY341495 do receptorów mGluR2/3 w korze przedczołowej w obu grupach zwierząt otrzymujących kokainę (Rysunek 3 prezentowanej pracy **P-3**). Nie stwierdzono jednak istotnych zmian w ekspresji białek receptorów mGluR2/3 w homogenacie badanych struktur mózgowych, co potwierdza poprzednie obserwacje (Knackstedt i wsp., 2010; Ghasemzadeh i wsp., 2009)[18, 19] i sugeruje raczej przesunięcie receptorów do puli membranowej niż wzmożenie ekspresji białkowej.

Podanie zwierzętom, które po fazie podtrzymania nałogu przeszły 10-dniowy trening odstawienia wywołującej dawki kokainy (10 mg/kg, *ip*) spowodowało u zwierząt nawrót zachowań poszukiwawczych w grupie aktywnie

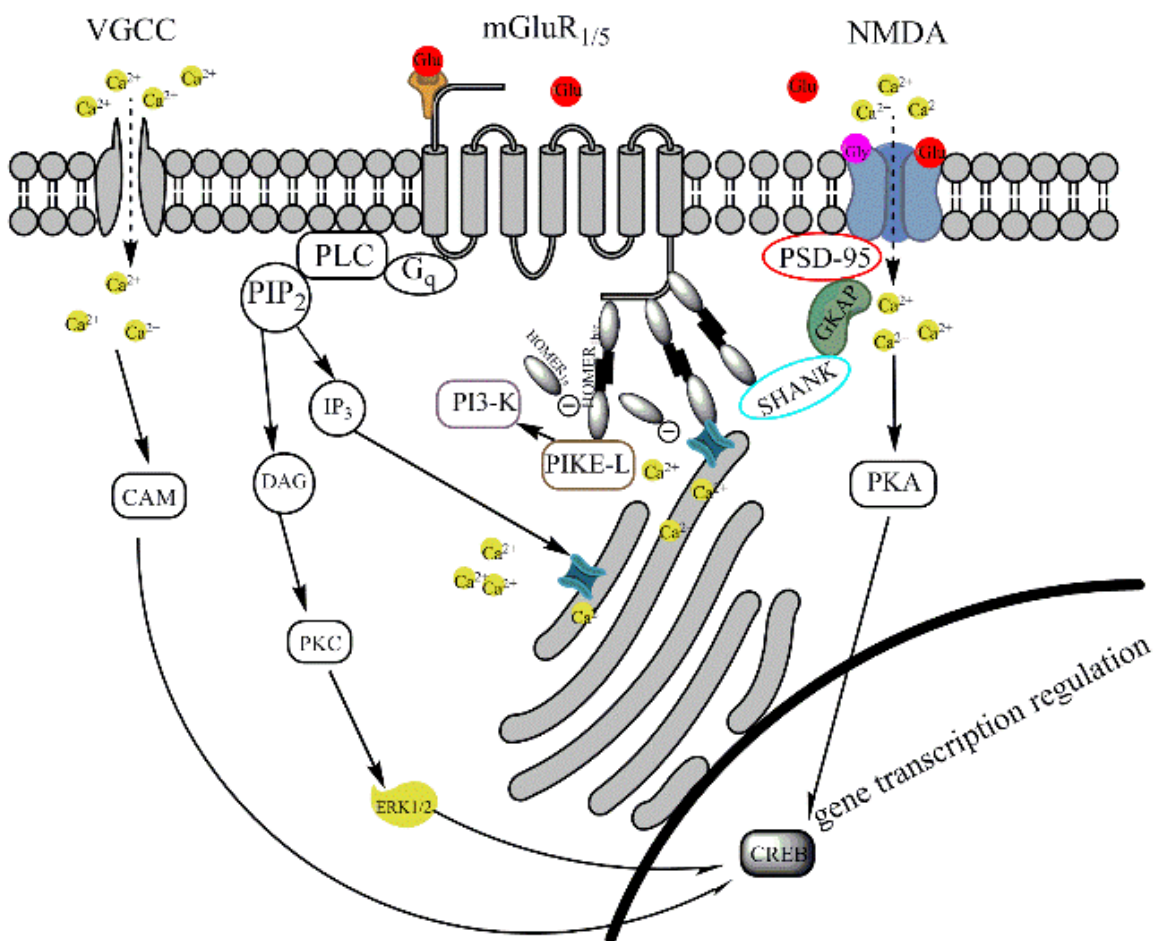
pobierającej kokainę w pierwszej fazie eksperymentu (wzmoczone naciskanie na dźwignię aktywną) a analizy biochemiczne wzmoczoną gęstość receptorów mGluR2/3 w korze przedczołowej. Powinowactwo liganda pozostało jak w poprzedniej fazie osłabione w obu grupach chronicznie otrzymujących kokainę. Badanie ekspresji białkowej nie wykazało zmian istotnych statystycznie (Rysunek 4 prezentowanej pracy P-3).

Wnioski: Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że receptory mGluR2/3 zlokalizowane w korze przedczołowej i grzbietowym prążkowie są istotnym punktem uchwytu we wszystkich fazach uzależnienia od kokainy. Zarówno aktywne samopodawanie kokainy jak i bierne jej otrzymywanie wywołuje w tych strukturach up-regulację receptorów mGluR2/3, a zmiana ta ulega odwróceniu w czasie odstawienia kokainy. Wyniki wskazują również na istotne upośledzenie wiązania liganda, co potwierdza i wzmacnia wyniki wcześniejszych badań funkcji receptorów mGluR2/3.

P-4 - Pomierny-Chamiolo L, Miszkiewicz J, Frankowska M, Pomierny B, Niedzielska E, Smaga I, Fumagalli F, Filip M. „Withdrawal from cocaine self-administration and yoked cocaine delivery dysregulates glutamatergic mGlu5 and NMDA receptors in the rat brain”. *Neurotoxicity Research* 2015 Apr;27(3):246-258
(Springer; **IF₂₀₁₅ = 3.140**; MNiSW ₂₀₁₅ = 25 pkt)

Indukowane przez kokainę zmiany w transmisji glutaminianergicznej przyczyniają się do powstania zmian nie tylko w obrębie receptorów metabotropowych, ale również receptorów jonotropowych NMDA odpowiedzialnych za szybką transmisję glutaminianergiczną, zarówno w korowych jak i podkorowych rejonach mózgu. Receptory NMDA oraz mGluR5 pozostają we wzajemnej interakcji, co zobrazowano na rysunku 3.

Receptor NMDA jest kompleksem białkowym, złożonym z czterech podjednostek tworzących kanał jonowy przepuszczalny dla jonów Na⁺, Ca²⁺ i K⁺. Dwie z nich to konstytutywna podjednostka GluN1 a dwie kolejne należą do rodziny GluN2 lub rzadziej GluN3. Każda z podjednostek może występować w kilku formach *splice variants*. Budowa podjednostkowa receptorów warunkuje ich aktywność. Sugeruje się zależność między wpływem indukującym powstawanie LTP i LTD a rodzajem podjednostki GluN2 (Schotanus i Chergui 2008)[3].



Rysunek 3. Interakcje pomiędzy receptorami mGluR1/5 a NMDA ze szlakiem sygnałowym na neuronach postsynaptycznych. Białka rusztowania Shank-GKAP-PSD95 oraz Homer łączące oba receptory (P-4).

Kompleks białkowy mGluR5-Homer-NMDA jest w dużym stopniu zaangażowany w zjawiska plastyczności synaptycznej takie jak długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne (LTP i LTD) w przebiegu uzależnienia od kokainy (Anwyl 1999; Ferraguti i Shigemoto 2006; Ronesi i Huber 2008; Shen i Kalivas 2013)[20, 21, 22, 23]. Bazując na danych literaturowych podjęto się szczegółowej analizy ekspresji białek obu typów receptorów oraz białka Homer w opisanym wcześniej modelu dożylnego samopodawania kokainy. Wykorzystano analogiczny schemat generowania zwierząt, a ekspresję zbadano w czterech, opiszanych wcześniej, strukturach mózgowych.

Wyniki analizy receptorów mGluR5, opublikowane w tej pracy, wraz z wynikami badań radioreceptorowych oraz immunohistochemicznych omówiono w

rozdziale dotyczącym publikacji **P-2**. Poniżej opisano wyniki dotyczące analizy poszczególnych podjednostek receptora NMDA oraz białka Homer 1b/1c.

Aktywne pobieranie kokainy przez zwierzęta doświadczalne przez okres 16 dni spowodowało wzrost ekspresji białkowej podjednostek GluN1 i GluN2A kompleksu receptora NMDA w hipokampie i grzbietowym prążkowie (Rysunki 6 i 8 prezentowanej pracy **P-4**). Ponieważ zmiany takie nie zostały zaobserwowane u zwierząt biernie otrzymujących kokainę również w innych badaniach (Fitzgerald i wsp., 1996)[24], wydaje się, że mogłyby one stanowić molekularny marker zachowań motywacyjnych w uzależnieniach od psychostymulantów. Obie podjednostki GluN1 i GluN2A są odpowiedzialne za długotrwałe zmiany synaptyczne i tak podjednostka GluN1 kontroluje przepuszczalność dla jonów Ca²⁺, natomiast GluN2A sprzyja zjawisku LTP. Zaobserwowany w grzbietowym prążkowie wzrost ekspresji podjednostek GluN2A oraz białka receptora mGluR5 może być również mechanizmem kompensacyjnym w odpowiedzi na zmniejszony poziom podstawowy glutaminianu w prążkowie brzuszny stwierdzony w modelu samopodawania lub też niewielki jego wzrost w czasie sesji samopodawania (Wydra i wsp., 2013)[25].

10-dniowy trening odstawienia wywołał u zwierząt doświadczalnych (zarówno aktywnych jak i biernych) istotny wzrost ekspresji podjednostek GluN2A w korze przedczołowej (Rysunek 5 prezentowanej pracy **P-4**), co wydaje się być efektem działania farmakologicznego kokainy. Wyniki innego zespołu (Ary i Szumlinski, 2007)[26] oraz nasze mogą sugerować, że kinetyka zmienionych receptorów jest szybsza niż u zwierząt kontrolnych (Yashiro i Philpot, 2008)[27]. Takie zmiany mogą być także związane z upośledzeniem pamięci lub zwiększonym poziomem lęku wywołanego kontekstem bądź też bodźcem warunkowym. Zaobserwowano ponadto zwiększoną ekspresję podjednostek GluN1 w hipokampie i jądrze półęzającym przegrody (Rysunki 6 i 7 prezentowanej pracy **P-4**). Zmiany te były równoległe zarówno u zwierząt aktywnie jak i biernie pobierających kokainę w pierwszej fazie eksperymentu. Jednakże, co ciekawe, tylko u zwierząt samopobierających kokainę w tej fazie stwierdzono w hipokampie wzrost ekspresji podjednostek GluN2A i GluN2B. Zmiany te, wraz z istotnym wzrostem ekspresji receptorów mGluR5, mogą być efektem kompensacyjnym z powodu zaburzonej przez kokainę neurogenezy i procesów pamięciowych w komórkach hipokampa. W grzbietowym prążkowie zwierząt odstawionych od

aktywnego pobierania kokainy stwierdzono obniżoną ekspresję receptorów mGluR5 oraz związanego z nimi białka rusztowania Homer 1b/1c, natomiast w prążkowie zwierząt biernie otrzymujących kokainę spadek ekspresji podjednostek GluN1 (Rysunek 8 prezentowanej pracy **P-4**). Podobne zmiany obserwowane były wcześniej w innych warunkach eksperymentalnych (Ghasemzadeh i wsp., 2009c; Ben-Shahar i wsp., 2009)[28][29], więc ze względu na spójność wyników można wnioskować, że trening odstawienia jest istotny dla zmian w plastyczności zależnej od glutaminianu w obrębie prążkowie.

Wnioski: Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują na powstanie licznych zmian w obrębie badanych receptorów, zależnych od struktury oraz sposobu podania kokainy. Nie zaobserwowano jednak korelacji pomiędzy zmianami w obrębie badanych receptorów mGluR5 i NMDA a zmianami w obrębie białka rusztowania Homer 1b/1c w innych badanych strukturach poza prążkowie. Opisanie zmiany w kompozycji kompleksu receptora NMDA mogą również częściowo tłumaczyć zmiany neuropsychiatryczne obserwowane w przebiegu uzależnienia od kokainy.

P-5 - Pomierny-Chamiolo L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M. "Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine". *Neurotoxicity Research* 2013 Jan;23(1):92-102 (Springer; **IF**₂₀₁₃ = **3.151**; MNiSW ₂₀₁₅ = 25 pkt)

Różnice w wyzwalanych przez kokainę stężeniach glutaminianu pomiędzy jej aktywnym i biernym przyjmowaniem sprawiają, że neurony wystawione są na odmienne stężenia tego neuroprzekaźnika. Biernie, wielokrotne podanie kokainy powoduje zmniejszenie uwalniania glutaminianu do przestrzeni synaptycznej w kolejnych sesjach. W czasie sesji samopodawania kokainy dochodzi do jego zwiększonego uwalniania (Suto i wsp., 2010)[30]. Narażenie neuronów na wysokie stężenia glutaminianu powoduje silną aktywację receptorów glutaminergicznych jonotropowych NMDA i AMPA, a co za tym idzie nasila mitochondrialny wychwyt jonów Ca²⁺ (Rego i Oliveira, 2003)[31]. Taki wpływ może nasilać produkcję reaktywnych form tlenu oraz peroksydację lipidów. Z drugiej strony nasilone uwalnianie dopaminy i hamowanie jej wychwytu zwrotnego również nasila proces

uszkodzenia błon komórkowych (Dietrich i wsp., 2005; Bashkatova i wsp., 2006)[32, 33].

Dane literaturowe donoszą o indukującym stres oksydacyjny wpływie ostrego podania kokainy, brak natomiast badań na modelu samopodawania oceniających nasilenie markerów stresu oksydacyjnego w strukturach mózgowych oraz narządach obwodowych. W badaniach, których wyniki opublikowano w niniejszej pracy oceniano aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz poziom malonyldialdehydu (MDA) jako markera peroksydacji lipidów w wybranych strukturach mózgowych (hipokamp, grzbietowe prążkowie oraz kora czołowa, a także narządach obwodowych (wątroba, nerki i serce). Wykorzystano model dożylnego samopodawania kokainy ze sprzężeniem grup kontrolnych, analogiczny do przedstawionego w poprzednich pracach.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała znaczny wzrost aktywności SOD w grupie zwierząt aktywnie pobierających kokainę przez okres 16 dni (Rysunek 2 prezentowanej pracy **P-5**), we wszystkich badanych strukturach mózgowych, z równoczesnym spadkiem stężenia MDA. W grupie zwierząt otrzymujących kokainę w sposób bierny spadek stężenia MDA zaobserwowano jedynie w grzbietowym prążkowie (Rysunek 3 prezentowanej pracy **P-5**). Zaskakującymi były wyniki wskazujące na fakt, że aktywne pobieranie kokainy wywołuje większe uszkodzenia oksydacyjne i bardziej upośledza obronę antyoksydacyjną niż bierne jej otrzymywanie. Różnice te mogą być efektem odmiennego wpływu sposobu podania kokainy na stężenie podstawowe i indukowane glutaminy i dopaminy w szczelinie synaptycznej, gdyż wyższe poziomy tych neuroprzekaźników były odnotowane w grupie zwierząt pobierających kokainę w sposób aktywny (Suto i wsp., 2010; Wydra i wsp., 2013)[30, 25].

Po 10-dniowym treningu odstawienia od samopodawania kokainy nadal obserwowano istotnie zwiększoną aktywność SOD w badanych strukturach mózgowych (Rysunek 6 prezentowanej pracy **P-5**). Wyniki te korespondują z istotnym podwyższeniem stężenia MDA również we wszystkich badanych strukturach mózgowych, z wyjątkiem grzbietowego prążkowie, gdzie stwierdzono spadek jego poziomu. W strukturze tej obrona antyoksydacyjna wydaje się nie być załamana przez reaktywne formy tlenu. Należy również zaznaczyć, że w grupie zwierząt biernie otrzymujących kokainę poziom MDA był także wyższy niż u

zwierząt kontrolnych, jednakże istotne zwiększenie aktywności SOD zaobserwowano jedynie w hipokampie (Rysunek 7 prezentowanej pracy **P-5**). Zmiany takie świadczą mogą o oporności niektórych rejonów mózgu wobec zwiększonego stężenia reaktywnych form tlenu indukowanego podaniem kokainy. Należy zaznaczyć, że pomimo stwierdzonej wzmożonej peroksydacji lipidów (w naszej pracy oraz Dietrich i wsp., 2005) [32], zmniejszonego poziomu glutationu i aktywności peroksydazy glutationowej (Muriach i wsp., 2010)[34] nie zaobserwowano pod wpływem chronicznego podawania kokainy (*ip*) zmian apoptotycznych w strukturach mózgowych, natomiast wykazanie czy podanie dożylne powoduje zmiany neurodegeneracyjne w procesie kaspazo-3-zależnej apoptozy wymaga dalszych badań.

Analiza markerów stresu oksydacyjnego w narządach obwodowych wykazała istotny wzrost aktywności SOD w wątrobie zwierząt otrzymujących kokainę, bez względu na sposób podania (aktywny czy bierny), podczas gdy w fazie odstawienia zmiany takie zaobserwowano tylko w nerkach. Stężenie MDA w fazie podtrzymania nałogu było istotnie wyższe w grupie zwierząt aktywnie pobierających kokainę, zaś w fazie odstawienia zarówno w grupie aktywnej jak i biernej.

Wnioski: Przedstawione w powyższej pracy wyniki wskazują po raz pierwszy, na związek pomiędzy biomarkerami stresu oksydacyjnego a zachowaniami motywacyjnymi w celu przyjęcia kokainy przez szczury. Ponieważ stres oksydacyjny odgrywa rolę w procesach pamięci i uczenia się, wydaje się, że zaburzenia tych funkcji mogą być związane z toksycznością kokainy, jej wpływem na poziomy neuroprzebieżników takich jak dopamina i glutamianian w przestrzeni synaptycznej i okołosynaptycznej oraz mechanizmami rozwoju uzależnienia.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

3.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie studiów farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym UJCM zainteresowałam się tematyką roli układu nerwowego w rozwoju chorób.

Rozpoczęłam udział w badaniach nad rolą autonomicznego układu nerwowego w patofizjologii chorób układu krążenia, które prowadzone były w Katedrze Patofizjologii UJCM pod kierownictwem Prof. dr hab. med. Piotra Thora i we współpracy z klinikami Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Rezultaty tych badań stanowiły później podstawę mojej pracy magisterskiej pt. „Wpływ leków β -adrenolitycznych na przykładzie bisoprololu na aktywność nerwowego układu autonomicznego u chorych ze stabilną dławicą piersiową”, która realizowana była w II Klinice Kardiologii UJCM pod opieką Dr hab. n. med. Władysławy Kolasińskiej-Kloch.

Dalszą pracę naukową podjęłam na studiach doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym UJCM pod kierownictwem Prof. dr hab. Gabriela Nowaka. Temat prowadzonych wówczas w Katedrze Farmakobiologii badań również oscylował wokół układu nerwowego i jego roli w patomechanizmie chorób. Skupiłam się na badaniu roli nerwowego układu glutaminianergicznego w rozwoju depresji i mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Badania prowadzone były z wykorzystaniem testów i modeli zwierzęcych we współpracy z Zakładem Neurobiologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, a ich rezultaty zostały opublikowane w impaktowanych czasopismach w pracach **D-1 - D-3**. Odkrycie i dostępność selektywnych antagonistów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy I związków MPEP i MTEP umożliwiło mi podjęcie szczegółowych badań nad rolą receptorów mGluR5 w depresji i mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Wyniki tych eksperymentów stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej.

3.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora moją pracę naukową kontynuowałam w Katedrze Toksykologii UJCM, gdzie zostałam zatrudniona na etacie asystenta a po 9 miesiącach mój etat zmieniono na etat adiunkta. Główny temat badawczy, który podjęłam skupia się również wokół układu glutaminianergicznego i jego roli w powstawaniu zaburzeń neuropsychiatrycznych, ze szczególnym uwzględnieniem uzależnień. Uzyskane przez mnie ze środków NCN finansowanie projektu grantowego pozwoliło mi na szeroko zakrojone badania wybranych receptorów jono- i metabotropowych w strukturach mózgowych w kolejnych fazach uzależnienia od kokainy. Rezultatem tej pracy są publikacje, które stanowią

podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (**P-1 - P-5**) oraz dwa rozdziały w anglojęzycznej publikacji książkowej wydanej przez wydawnictwo Springer Science + Business Media (**M-1 - M-2**).

We współpracy z Pracownią Farmakologii Uzależnień Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie podjęłam się realizacji zadań jako wykonawca w projekcie grantowym NCN, prowadzonym przez Dr Małgorzatę Frankowską, a dotyczącym roli receptorowych kompleksów heterodimerycznych mGluR5-D2 w uzależnieniu od kokainy i MDMA. Projekt został niedawno zakończony i prace naukowe opisujące wyniki tych badań są obecnie w trakcie recenzji.

Równolegle, we współpracy z Katedrą Farmakobiologii UJCM oraz Zakładem Neurobiologii IF PAN w Krakowie, kontynuowałam badania nad rolą układu glutaminianergicznego w patomechanizmie depresji i mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Efektem tej pracy są opublikowane prace (**D-4 - D6 i D9**).

Brałam również udział w wielośrodkowym międzynarodowym projekcie naukowym kierowanym przez Prof. Christiana Müllera z Katedry Psychiatrii i Psychoterapii Kliniki Uniwersyteckiej, Uniwersytetu Erlangen w Niemczech dotyczącym uzależnienia od alkoholu. Efektem tej pracy jest publikacja opublikowana w tym roku w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania IF=11.36 (**D-12**).

Byłam także wykonawcą w projekcie grantowym dotyczącym roli układu endokannabinoidowego w patogenezie depresji i w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych, którego kierownikiem była Prof. dr hab. Małgorzata Filip. Badania w których wzięłam udział zostały opublikowane w publikacji **D-7**.

Ponadto brałam udział w badaniach prowadzonych przez Zakład Biochemii Toksykologicznej UJCM nad neurotoksycznym działaniem eterów glikolu etylowego pod kierownictwem Prof. dr hab. Bogusławy Budziszewskiej. Badania te były przedmiotem projektu grantowego, a ich wyniki zostały opublikowane w impaktowanych czasopismach (**D-8 i D-10**).

Od 2015 roku podjęłam kolejny temat badawczy, również związany z receptorami układu glutaminianergicznego. Dotyczy on wpływu diety matki w okresie ciąży i karmienia na podatność na choroby neuropsychiatryczne u potomstwa. Po wykonaniu wstępnych badań w ubiegłym roku uzyskałam finansowanie dwóch przygotowanych przez mnie projektów: z Narodowego

Centrum Nauki projektu pt. „Wpływ diety wysokotłuszczowej i wysokocukrowej matki na powstawanie zaburzeń w budowie receptorów NMDA potomstwa oraz regulacji ich aktywności w kontekście zaburzeń pamięci” oraz ze środków UJCM projektu pt. „Zmiany w poziomie neuropeptydów i ekspresji ich receptorów w strukturach mózgowych potomstwa matek karmionych dieta wysokotłuszczowa i wysokocukrowa w okresie ciąży”. W obu projektach pełnię funkcję kierownika projektu i najbliższych latach wokół tych tematów będzie skupiała się moja aktywność naukowo-badawcza.

4. Piśmiennictwo

- [1] Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403–13. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1403.
- [2] Cleva RM, Hicks MP, Gass JT, Wischerath KC, Plasters ET, Widholm JJ, et al. mGluR5 positive allosteric modulation enhances extinction learning following cocaine self-administration. *Behav Neurosci* 2011;125:10–9. doi:10.1037/a0022339 [doi].
- [3] Kenny PJ, Boutrel B, Gasparini F, Koob GF, Markou A. Metabotropic glutamate 5 receptor blockade may attenuate cocaine self-administration by decreasing brain reward function in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:247–54.
- [4] Peters J, Kalivas PW. The group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY379268, inhibits both cocaine- and food-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;186:143–9.
- [5] Przegalinski E, Filip M. Stimulation of serotonin (5-HT)1A receptors attenuates the locomotor, but not the discriminative, effects of amphetamine and cocaine in rats. *Behav Pharmacol* 1997;8:699–706.
- [6] McCreary AC, Marsden CA. Cocaine-induced behaviour: dopamine D1 receptor antagonism by SCH 23390 prevents expression of conditioned sensitisation following repeated administration of cocaine. *Neuropharmacology* 1993;32:387–91.
- [7] Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer S, Smith ACW, et al. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev* 2016;68:816–71. doi:10.1124/pr.116.012484.
- [8] Preti A. New developments in the pharmacotherapy of cocaine abuse. *Addict Biol* 2007;12:133–51. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00061.x.

- [9] Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, et al. Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* 2001;4:873–4. doi:10.1038/nn0901-873.
- [10] Backstrom P, Hyytia P. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor antagonism attenuates cue-induced cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:778–86. doi:10.1038/sj.npp.1300845.
- [11] Baptista MA, Martin-Fardon R, Weiss F. Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *J Neurosci* 2004;24:4723–7. doi:10.1523/JNEUROSCI.0176-04.2004.
- [12] Adewale AS, Platt DM, Spealman RD. Pharmacological stimulation of group II metabotropic glutamate receptors reduces cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:922–31. doi:10.1124/jpet.106.105387.
- [13] Bauzo RM, Kimmel HL, Howell LL. Interactions between the mGluR2/3 agonist, LY379268, and cocaine on in vivo neurochemistry and behavior in squirrel monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:204–10. doi:10.1016/j.pbb.2009.08.011; 10.1016/j.pbb.2009.08.011.
- [14] Lu L, Xue Y, Steketee JD, Rebec G V, Sun W. Regulation of cocaine-induced reinstatement by group II metabotropic glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;220:75–85. doi:10.1007/s00213-011-2455-5.
- [15] Justinova Z, Le Foll B, Redhi GH, Markou A, Goldberg SR. Differential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on nicotine versus cocaine self-administration and relapse in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:1791–800. doi:10.1007/s00213-015-3994-y.
- [16] Morishima Y, Miyakawa T, Furuyashiki T, Tanaka Y, Mizuma H, Nakanishi S. Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4170–5.
- [17] Lovinger DM. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 2010;58:951–61. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.01.008; 10.1016/j.neuropharm.2010.01.008.
- [18] Knackstedt LA, Moussawi K, Lalumiere R, Schwendt M, Klugmann M, Kalivas PW. Extinction training after cocaine self-administration induces glutamatergic plasticity to inhibit cocaine seeking. *J Neurosci* 2010;30:7984–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.1244-10.2010.
- [19] Ghasemzadeh MB, Mueller C, Vasudevan P. Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased glutamate receptor trafficking to the postsynaptic density after extended withdrawal period. *Neuroscience*

- 2009;159:414–26. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.027; 10.1016/j.neuroscience.2008.10.027.
- [20] Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Res Rev* 1999;29:83–120.
- [21] Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 2006;326:483–504. doi:10.1007/s00441-006-0266-5.
- [22] Ronesi JA, Huber KM. Homer interactions are necessary for metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression and translational activation. *J Neurosci* 2008;28:543–7.
- [23] Shen H, Kalivas PW. Reduced LTP and LTD in prefrontal cortex synapses in the nucleus accumbens after heroin self-administration. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:1165–7. doi:10.1017/S1461145712001071; 10.1017/S1461145712001071.
- [24] Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler EJ. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 1996;16:274–82.
- [25] Wydra K, Golembiowska K, Zaniewska M, Kaminska K, Ferraro L, Fuxe K, et al. Accumbal and pallidal dopamine, glutamate and GABA overflow during cocaine self-administration and its extinction in rats. *Addict Biol* 2013;18:307–24. doi:10.1111/adb.12031.
- [26] Ary AW, Szumlinski KK. Regional differences in the effects of withdrawal from repeated cocaine upon Homer and glutamate receptor expression: a two-species comparison. *Brain Res* 2007;1184:295–305. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.035.
- [27] Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008;55:1081–94. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.046 [doi].
- [28] Ghasemzadeh MB, Vasudevan P, Mueller C, Seubert C, Mantsch JR. Region specific alterations in glutamate receptor expression and subcellular distribution following extinction of cocaine self-administration. *Brain Res* 2009. doi:10.1016/j.brainres.2009.01.047.
- [29] Ben-Shahar O, Obara I, Ary AW, Ma N, Mangiardi MA, Medina RL, et al. Extended daily access to cocaine results in distinct alterations in Homer 1b/c and NMDA receptor subunit expression within the medial prefrontal cortex. *Synapse* 2009;63:598–609. doi:10.1002/syn.20640; 10.1002/syn.20640.
- [30] Suto N, Ecke LE, You ZB, Wise RA. Extracellular fluctuations of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens core and shell associated with lever-pressing during cocaine self-administration, extinction, and yoked cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;211:267–75. doi:10.1007/s00213-010-1890-z; 10.1007/s00213-010-1890-z.
- [31] Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen

species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 2003;28:1563–74.

- [32] Dietrich J-B, Mangeol A, Revel M-O, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology* 2005;48:965–74. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.01.018.
- [33] Bashkatova V, Meunier J, Vanin A, Maurice T. Nitric oxide and oxidative stress in the brain of rats exposed in utero to cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1074:632–42. doi:10.1196/annals.1369.061.
- [34] Muriach M, Lopez-Pedrajas R, Barcia JM, Sanchez-Villarejo M V, Almansa I, Romero FJ. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem* 2010;114:675–84. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06794.x.
- [35] Filip M., Przegalinski E.: Rola układu serotoninowego w uzależnieniu od kokainy. W:Przewłocka B. (red.) Uzależnienia lekowe, opiaty i środki psychostymulujące. XXII Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany. 2005, 79-94

dr n. farm.

Lucyna Pomierny-Chamióło

