

Załącznik 2a

Autoreferat zawierający opis dorobku i osiągnięć naukowo-badawczych oraz opis działalności dydaktycznej i organizacyjnej



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Małgorzata Knapik-Czajka

Kraków 2015

Spis treści.

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	1
2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	2
3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM).....	3
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
3.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji.....	3
3.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	4
3.3.1. Wprowadzenie	4
3.3.2. Cel i zakres prowadzonych badań.....	13
3.3.3. Omówienie wyników przeprowadzonych badań	14
3.3.3.1. Wpływ niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego [P1-P2].	14
3.3.3.2. Wpływ simwastatyny na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów w tkance wątrobowej szczurów w warunkach prawidłowej oraz ograniczonej podaży białka pokarmowego [P3].	18
3.3.3.3. Wpływ niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranu w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego [P4].	22
3.3.4. Wpływ wybranych leków hipolipemicznych na metabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach [P5].....	25
3.3.5. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji	25
<i>PIŚMIENNICTWO</i>	27
4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	32
4.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	32
4.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	34
4.3. Udział w projektach badawczych.....	37
4.4. Udział w kursach i szkoleniach zawodowych.....	37
5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNO-ORGANIZACYJNA	39

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

1991- stopień magistra analityki medycznej, dyplom z wyróżnieniem

Akademia Medyczna, Kraków (obecnie Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum),
Wydział Farmaceutyczny

Tytuł pracy: Apoproteiny osocza krwi-własności i funkcje.

Promotor: Prof. dr hab.med. Halina Szafran

2002- stopień doktora nauk farmaceutycznych (wyróżnienie rozprawy doktorskiej)

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny,

Tytuł pracy: Wpływ wybranych pochodnych kwasu kłofibrowego na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych alfa ketokwasów (BCKDH).

Promotor: Prof. dr hab.med. Jerzy Jaśkiewicz; Dyscyplina: Biochemia

2013- dyplom ukończenia studiów podyplomowych: Badania Kliniczne Produktów Leczniczych

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Kraków

Posiadane Specjalizacje

2003- I stopień specjalizacji w zakresie Analityki Klinicznej, Kraków

2003-Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1.10.1991-30.09.1997 - Katedra Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna, Kraków (obecnie Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum) - asystent

1.10.1997-30.09.2002 - Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum – asystent

1.10.2002-28.02.2012 - Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum – adiunkt

1.03.2012-nadal - Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum - starszy wykładowca

25.02.2005-29.02.2009 - Biomarker Research Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA - visiting scholar

3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm).

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Pracę habilitacyjną stanowi cykl pięciu prac naukowych (czterech oryginalnych oraz jednej przeglądowej) opublikowanych w latach 2009-2015 objętych wspólnym tytułem „Wpływ niektórych leków hipolipemicznych na aktywność kompleksów enzymatycznych należących do dehydrogenaz 2-oksokwasów.”

3.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

P1. Knapik-Czajka M, Gozdzińska A, Jaskiewicz J. Adverse effect of fenofibrate on branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in rat's liver. *Toxicology*, 2009, 266, 1-5.

wskaźnik *Impact Factor* 2009: 3.241; punktacja KBN/MNiSW: 24.000

P2. Knapik-Czajka M. Stimulation of rat liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity by low doses of bezafibrate. *Toxicology* 2013, 306, 101-107.

wskaźnik *Impact Factor* 2013: 3.745; punktacja KBN/MNiSW: 35.000

P3. Knapik-Czajka M. Simvastatin increases liver branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase activity in rats fed with low-protein diet. *Toxicology* 2014, 325, 107-114.

wskaźnik *Impact Factor* 2014: 3.621; punktacja KBN/MNiSW: 35.000

P4. Knapik-Czajka M. Effect of low doses of bezafibrate and fenofibrate on liver 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in low protein diet fed rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2015, 10, 505-512.

wskaźnik *Impact Factor* 2014: 1.052; punktacja KBN/MNiSW: 15.000

P5. Knapik-Czajka M. Wpływ wybranych leków hipolipemicznych na metabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. *Farmacja Polska* 2015, 71, 415-420.

wskaźnik **Impact Factor**₂₀₁₄: **0,000**; punktacja **KBN/MNiSW**: **3.000**

Zgodnie z analizą bibliometryczną sumaryczny wskaźnik **Impact Factor** prac włączonych do cyklu wynosi **11,659 pkt.**, a odpowiadająca mu **punktacja KBN/ MNiSW** wynosi **112 pkt.**

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie wieloautorskich publikacji znajduje się w załączniku 3 część I, pkt. B.

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie prac wieloautorskich znajdują się w załączniku 6.

3.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

3.3.1. Wprowadzenie

W skład rodziny wieloenzymatycznych kompleksów mitochondrialnych dehydrogenaz 2-oksokwasów wchodzi trzy kompleksy, które wykazują podobieństwo strukturalne i funkcjonalne. Należą do nich dehydrogenaza rozgałęzionych α -ketokwasów (*ang.* branched-chain α -keto acid dehydrogenase - BCKDH; EC 1.2.4.4), dehydrogenaza 2-oksoglutaranu (*ang.* 2-oxoglutarate dehydrogenase - 2-OGDH, nazywana też dehydrogenazą α -ketoglutaranu-*ang.* α -ketoglutarate dehydrogenase, KGDH; EC 1.2.4.2) oraz dehydrogenaza pirogronianowa (*ang.* pyruvate dehydrogenase - PDH; EC 1.2.4.1), które katalizują tlenową dekarboksylację odpowiednich 2-oksokwasów. Kompleksy te pełnią kluczową rolę odpowiednio w: katabolizmie aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (leucyny, izoleucyny i waliny - *ang.* branched-chain amino acids, BCAAs), cyklu Krebsa oraz metabolizmie glukozy [1].

Kompleks BCKDH zbudowany jest z wielu kopii trzech podjednostek katalitycznych: dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (składowa E1, będąca heterotetramerem: $E1\alpha_2E1\beta_2$), transacylazy dihydrolipoamidowej, stanowiącej rdzeń kompleksu (składowa E2) oraz dehydrogenazy dihydrolipoamidowej (składowa E3).

Podjednostka E3 jest luźno związana z BCKDH i po dysocjacji może łączyć się z innymi kompleksami należącymi do rodziny dehydrogenaz 2-oksokwasów [2]. Ponadto w skład BCKDH wchodzi enzymy regulatorowe, specyficzna kinaza i specyficzna fosfataza, które mogą łączyć się i odłączać od kompleksu, w zależności od warunków metabolicznych [3, 4].

Kompleks BCKDH, katalizujący nieodwracalną reakcję tlenowej dekarboksylacji α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, jest kluczowym enzymem katabolizmu BCAAs. Leucyna, walina i izoleucyna muszą być przyjmowane z pożywieniem, ponieważ nie są syntetyzowane w organizmie ssaków [5].

Podstawową rolę BCAAs w ustroju jest ich udział, jako substratów, w syntezie białek. Ponadto BCAAs, a głównie leucyna, mają liczne funkcje regulatorowe. Szczególną rolę pełnią BCAAs w mięśniach szkieletowych. BCAAs stanowią około 50% aminokwasów pobieranych przez mięśnie szkieletowe oraz 14 do 18% wszystkich aminokwasów budujących białka mięśni [6, 7]. BCAAs są nie tylko substratem do budowy białek, ale również regulują ten proces. BCAAs nasilają syntezę białek mięśniowych (na etapie translacji) i ograniczają ich degradację [8, 9]. BCAAs stanowią także źródło energii dla mięśni szkieletowych. Leucyna promuje również pobieranie glukozy przez mięśnie szkieletowe [10]. Dlatego zmiana stężenia BCAAs może prowadzić do zaburzenia metabolizmu miocytów, w tym równowagi między syntezą i degradacją białek mięśniowych, a w konsekwencji do nieprawidłowego funkcjonowania mięśni szkieletowych. Stwierdzono także, że niezaburzony metabolizm BCAAs jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania mięśnia sercowego oraz wątroby [11, 12]. Aminokwasy te pobudzają syntezę albuminy, a także ograniczają proces apoptozy i przyspieszają regenerację hepatocytów. Ponadto, leucyna reguluje uwalnianie insuliny z komórek β wysp Langerhansa do osocza krwi [13]. BCAAs wykazują również wpływ na funkcję tkanki nerwowej, regulując transport tryptofanu i tyrozyny, substratów koniecznych do syntezy neurotransmiterów (serotoniny i katecholamin) [14].

Utrzymanie homeostazy w zakresie BCAAs jest bardzo istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Z jednej strony, ilość BCAAs musi być wystarczająca do pokrycia zapotrzebowania ustroju na te aminokwasy, z drugiej strony, zawartość tych

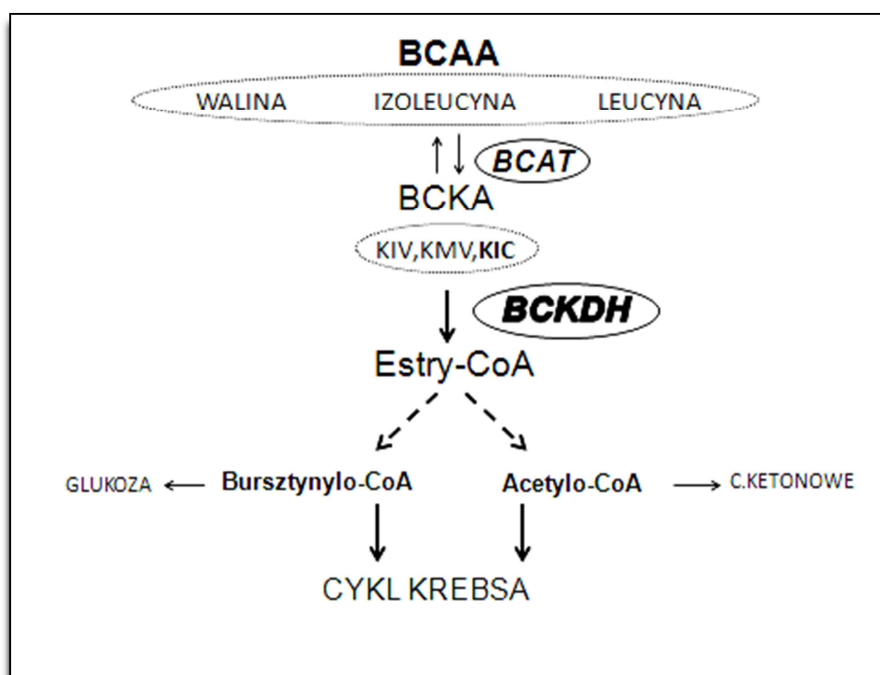
aminokwasów nie powinna być zbyt duża w stosunku do potrzeb, ponieważ nadmiar BCAAs i ich metabolitów może być toksyczny, szczególnie dla układu nerwowego [15].

Zasadniczym mechanizmem utrzymania odpowiedniego stężenia BCAAs w osoczu krwi jest modyfikacja szybkości katabolizmu BCAAs. Przy zbyt dużej ilości BCAAs w stosunku do potrzeb następuje przyspieszenie degradacji BCAAs. Z kolei, przy zmniejszonej podaży z pożywieniem, katabolizm BCAAs ulega ograniczeniu. W tych warunkach metabolicznych BCAAs są wykorzystywane przede wszystkim do syntezy białek.

Podstawowymi tkankami, które biorą udział w metabolizmie BCAAs (biorąc pod uwagę masę tkanek) są mięśnie szkieletowe, a także tkanka tłuszczowa. Mniejszy udział w metabolizmie BCAAs mają nerki, wątroba i mózg [16]. Zmiana szybkości katabolizmu BCAAs w jednej lub kilku tkankach, wywołana przez różne czynniki, może prowadzić do zmiany stężenia BCAAs w osoczu i różnych tkankach oraz zaburzenia syntezy białek oraz innych procesów regulowanych przez te aminokwasy. Na przykład, upośledzenie katabolizmu BCAAs, głównie w tkance tłuszczowej, skutkujące wzrostem stężenia tych aminokwasów w osoczu krwi, występuje u pacjentów z cukrzycą oraz u chorych z nadwagą lub otyłością [17, 18]. Z kolei, zaburzenie degradacji BCAAs w kardiomiocytach wiąże się z niewydolnością mięśnia sercowego [12]. Niektórzy autorzy proponują uznanie BCAAs za biomarkery ryzyka wystąpienia na przykład cukrzycy typu 2 i choroby sercowo-naczyniowej [19, 20]

Katabolizm BCAAs obejmuje początkowo takie same reakcje (Ryc. 1). W pierwszym etapie zachodzi odwracalna transaminacja katalizowana przez specyficzną aminotransferazę (*ang.* branched-chain aminotransferase, BCAT). Produktem tej reakcji są α -ketokwasy o rozgałęzionych łańcuchach (*ang.* branched chain α -ketoacids, BCKAs): α -ketoizowalerianian (KIV), α -keto- β -metyłowalerianian (KMV) i α -ketoizokapronian (KIC); powstające odpowiednio z waliny, izoleucyny i leucyny. Następnie, BCKAs ulegają nieodwracalnej dekarboksylacji tlenowej, katalizowanej przez BCKDH, do odpowiednich tioestrów-CoA [21]. Jest to kluczowy etap katabolizmu leucyny, waliny i izoleucyny. Kolejną reakcją jest odwodorowanie tioestrów acylo-CoA. Dalszy przebieg degradacji szkieletu węglowego jest już odmienny dla każdego z tych związków. Ostatecznie, w wyniku degradacji waliny powstaje bursztynylo-CoA, izoleucyny - propionylo-CoA (który

może być przekształcony do bursztynylo-CoA) i acetylo-CoA, a degradacja leucyny prowadzi do wytworzenia acetylo-CoA. Bursztynylo-CoA może być wykorzystany do syntezy glukozy, a acetylo-CoA do syntezy substancji ketonowych. Ponadto, w zależności od potrzeb danej tkanki, wszystkie produkty katabolizmu BCAAs mogą zostać zużyte jako materiał energetyczny, poprzez całkowite utlenienie do CO_2 i H_2O w cyklu Krebsa.

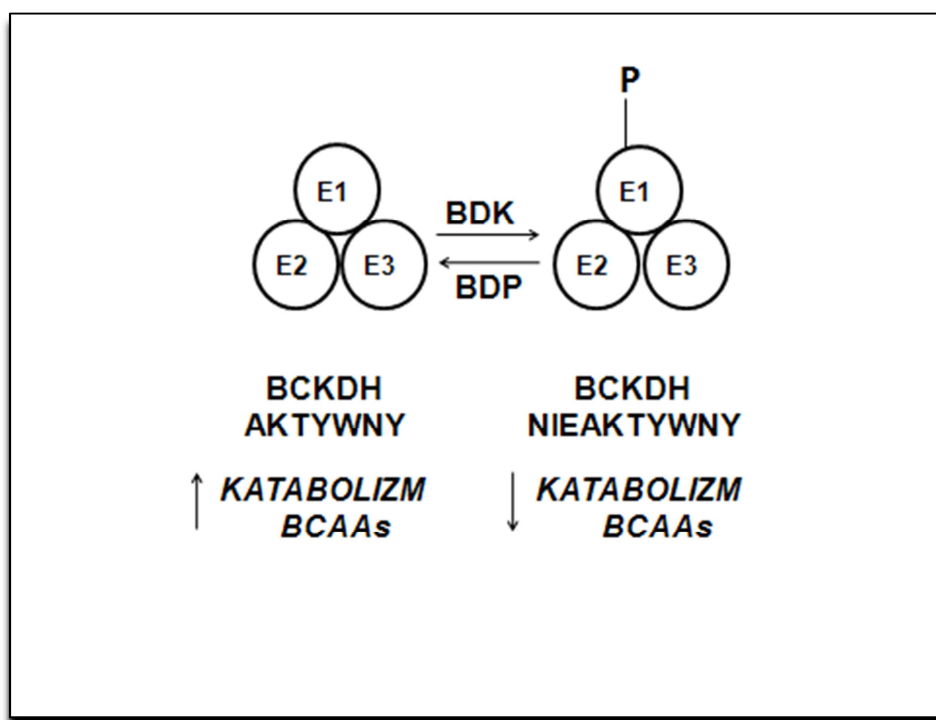


Ryc.1 Uproszczony schemat katabolizmu BCAAs [P5].

BCAA - aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach, BCKAs - α -ketokwasy o rozgałęzionych łańcuchach, BCAT - aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, BCKDH-kompleks dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów.

Aktywność BCKDH, która jak podano powyżej, determinuje szybkość katabolizmu BCAAs, regulowana jest wielokierunkowo: przez modyfikację kowalencyjną, przez produkty reakcji oraz przez zmianę ekspresji genów dla enzymów składowych kompleksu [22]. Powszechnie uważa się, że modyfikacja kowalencyjna, polegająca na odwracalnej fosforylacji, jest najważniejszym mechanizmem regulatorowym [23]. Kinaza kompleksu BCKDH (BDK) katalizuje fosforylację podjednostki E1 α , co hamuje aktywność BCKDH.

Niedawno opisana fosfataza tego kompleksu (*ang.* mitochondrial protein phosphatase 2Cm; PP2Cm, w niniejszym autoreferacie określana jako BDP) katalizuje defosforylację podjednostki E1 α oraz aktywację BCKDH [24]. Uproszczony schemat regulacji aktywności BCKDH poprzez odwracalną fosforylację przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc.2 Uproszczony schemat regulacji aktywności kompleksu BCKDH na zasadzie odwracalnej fosforylacji [P5].

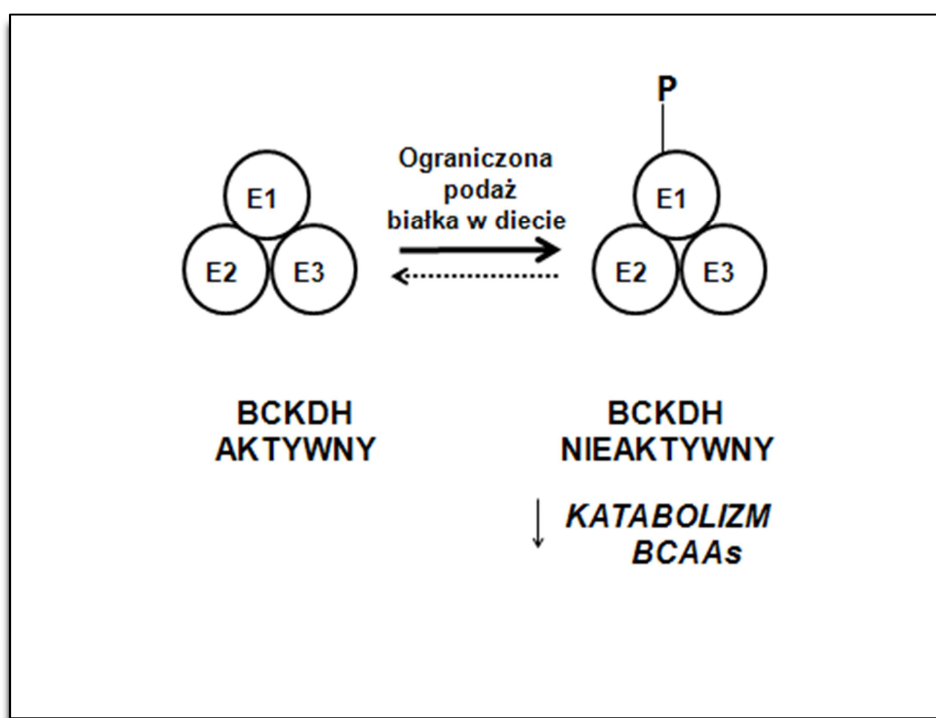
BDK-kinaza kompleksu BCKDH, BDP-fosfataza kompleksu BCKDH

Modyfikacji podlega również aktywność enzymów regulatorowych, BDK i BDP, przy czym najwięcej badań wykonano dla poznania regulacji BDK [3, 21, 25]. Wykazano, że aktywność tego enzymu jest regulowana na drodze długoterminowej, poprzez zmianę ekspresji genu oraz krótkoterminowej, poprzez bezpośredni, allosteryczny wpływ hamujący produktów transaminacji BCAAs, czyli odpowiednich α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (będących zarazem substratami dla BCKDH). Podstawowym, endogennym inhibitorem BDK jest α -ketoizokapronian (KIC), produkt transaminacji leucyny [26, 27]. Dowiedziono również, że pomiędzy BDK i BDP zachodzi konkurencja o

wiązanie do wspólnego substratu, czyli kompleksu BCKDH. Przyłączanie BDK lub BDP do kompleksu BCKDH jest w znacznym stopniu regulowane poziomem BCAAs i BCKAs (głównie KIC) w ustroju – małe stężenie tych związków promuje wiązanie BDK do BCKDH, zaś hamuje przyłączenie BDP, co skutkuje zahamowaniem aktywności BCKDH i degradacji BCAAs. Wysoki poziom BCAAs i BCKAs ma odwrotny wpływ na wiązanie enzymów regulatorowych do kompleksu BCKDH [4].

W wyniku działania BDK i BDP (związanych z kompleksem) następuje dynamiczna zmiana stopnia ufosforylowania podjednostki E1 α , a tym samym aktywności katalitycznej kompleksu BCKDH. Można zatem wyróżnić stan pełnej defosforylacji kompleksu, który określa się jako aktywność całkowitą (maksymalną) oraz stan częściowej defosforylacji, który definiuje się jako aktywność aktualną kompleksu BCKDH. Wylicza się również procent, nazywany stanem aktywności kompleksu BCKDH, całkowitej ilości enzymu występujący w stanie defosforylowanym, czyli aktywnym. Bieżąca aktywność katalityczna BCKDH, która wyznacza bezpośrednio szybkość katabolizmu BCAAs w danej tkance i w danych warunkach metabolicznych zależy od ilości enzymu występującego w aktywnej, defosforylowanej formie [23].

Dowodzono, że jednym z czynników modyfikujących aktywność BCKDH w wątrobie szczurów jest zawartość białka w pożywieniu. Przy diecie standardowej (zawierającej około 20% białka) aktywność BDK jest niewielka, na skutek czego prawie cały kompleks BCKDH cechuje się maksymalną aktywnością, czyli jest w pełni zdefosforylowany - stan aktywności BCKDH wynosi blisko 100%. Natomiast w warunkach braku lub ograniczonej podaży białka pokarmowego, występują istotne zmiany adaptacyjne kompleksu BCKDH. Polegają one na zmniejszeniu poziomu mRNA i białek dla podjednostek katalitycznych kompleksu BCKDH (E1 i E2) [28]. Równocześnie następuje wzrost poziomu mRNA, białka oraz aktywności kinazy BCKDH oraz zmniejszenie ilości mRNA dla BDP [4, 25, 29]. Dochodzi również do nasilenia wiązania BDK, zaś ograniczenia wiązania BDP do kompleksu. W konsekwencji opisanych zmian adaptacyjnych zmniejsza się aktywność katalityczna BCKDH [30, 31]. Degradacja egzogennych BCAAs ulega ograniczeniu, związki te są oszczędzane przede wszystkim dla syntezy białek. Uproszczony schemat modyfikacji aktywności BCKDH w wątrobie w odpowiedzi na ograniczoną podaż białka pokarmowego przedstawiono na Ryc. 3.



Ryc.3 Uproszczony schemat przedstawiający adaptację aktywności kompleksu BCKDH w wątrobie do ograniczonej podaży białka pokarmowego [P5].

BCAA - aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach

Stwierdzono także, że aktywność kompleksu BCKDH jest regulowana przez różne ksenobiotyki, w tym fibraty. Pochodne kwasu klofibrowego, w tym fenofibrat i bezafibrat, są współcześnie stosowane w terapii zaburzeń lipidowych. Związki te wykazują działanie hipolipemiczne, przede wszystkim poprzez zmniejszanie stężenia triglicerydów (*ang.* triglycerides, TG) oraz zwiększenie stężenia cholesterolu HDL w osoczu krwi, a także normalizację składu i wielkości cząstek LDL w kierunku większych i mniej gęstych (mniej aterogennych). Ostatnio, znaczenie fibratów jako leków uzupełniających terapeutyczne działanie statyn, wzrosło w świetle poglądu, że hipertriglicerydemia, obok hipercholesterolemii, powinna być traktowana jako istotny czynnik ryzyka wystąpienia choroby sercowo-naczyniowej [32]. Hipertriglicerydemia, niski poziom cholesterolu HDL oraz obecność małych, gęstych cząstek LDL są charakterystyczne dla złożonych zaburzeń lipidowych (określanych mianem dyslipidemii aterogennej), które występują często u

chorych na cukrzycę i zespół metaboliczny. Leczenie zaburzeń lipidowych, charakterystycznych dla dyslipidemii aterogennej jest szczególnym wskazaniem dla stosowania fibratów [33, 34]. Oprócz opisanego wpływu na parametry przemiany lipidowej fibraty wykazują także liczne, korzystne działania plejotropowe; w tym przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwzakrzepowe i poprawiające czynność śródbłónka naczyniowego [35].

Fibraty należą do leków dobrze tolerowanych przez większość osób. Znaczna część pojawiających się działań niepożądanych występuje dość rzadko i często ma charakter przejściowy. Do poważnych, chociaż rzadkich działań niepożądanych, występujących w trakcie terapii lekami hipolipemicznymi, zalicza się uszkodzenie mięśni szkieletowych, określane ogólnie jako miopatia. Patomechanizm miopatii nie został całkowicie wyjaśniony, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że jest związany z zaburzeniem funkcji miocytów, w tym ze zmianą metabolizmu mitochondrialnego, funkcjonowania kanałów chlorkowych, komórkowej homeostazy jonów wapniowych oraz metabolizmu energetycznego komórek [36].

Na poziomie molekularnym, pochodne kwasu fibrynowego regulują ekspresję genów dla różnych białek, poprzez aktywację specyficznych czynników transkrypcyjnych jakimi są receptory dla proliferatorów peroksysomów (PPAR) [37]. Najlepiej poznana jest regulacja ekspresji genów dla białek związanych z metabolizmem lipidów. Receptory PPAR występują w postaci 3 podtypów; PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ . Stwierdzono, że bezafibrat w odróżnieniu od pozostałych fibratów, w tym fenofibratu, które łączą się z receptorami PPAR α , może wiązać się także z PPAR β/δ i PPAR γ [38]. Niektórzy autorzy podejrzewają, że to odmienne działanie fenofibratu i bezafibratu na poziomie komórki, może być przyczyną występowania różnych efektów działania tych leków. Wykazano również, że fibraty regulują określone procesy metaboliczne w sposób niezależny od PPAR [39, 40].

Stwierdzono, że klofibrat, przedstawiciel fibratów wprowadzony najwcześniej do praktyki klinicznej, stosowany w dużych eksperymentalnych dawkach wpływa na aktywność kompleksu BCKDH [41]. Efekt klofibratu jest szczególnie nasilony przy ograniczonej podaży białka. Jak podano powyżej, fizjologicznie, w warunkach braku lub

niedoboru białka w diecie, aktywność BCKDH i katabolizm BCAAs w tkance wątrobowej są ograniczone [30, 31]. U szczurów żywionych paszą niskobiałkową, klofibrat, (w postaci aktywnego metabolitu kwasu klofibrowego) zaburza tę fizjologiczną adaptację poprzez zwiększenie aktywności BCKDH w wątrobie [42-44]. Klofibrat nasila ekspresję enzymów składowych kompleksu BCKDH (E1 i E2), równocześnie zmniejszając ekspresję genu dla BDK i aktywność tego enzymu. W konsekwencji działania klofibratu, następuje przyspieszenie degradacji BCAAs i zmniejszenie poziomu BCAAs w osoczu krwi [41, 45]. Takie działanie klofibratu może przyczyniać się do wystąpienia miopatii [46].

W ramach badań będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej, wykazałam, że fenofibrat i bezafibrat, dodawane do paszy niskobiałkowej (8% białka) szczurów w ilości 0,5%, co w przybliżeniu (uwzględniając ilość zjedzonej paszy) odpowiada dawce ponad 200 mg/kg m.ciała, działają na kompleks BCKDH w wątrobie, podobnie jak klofibrat. Stwierdziłam, że badane fibraty; z jednej strony zwiększają poziom mRNA dla podjednostek katalitycznych kompleksu (E1 i E2), zaś z drugiej zmniejszają poziom mRNA i aktywność BDK. W efekcie dochodzi do istotnego wzrostu aktywności katalitycznej kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów, pomimo ograniczonej ilości białka pokarmowego [47-49].

Wiadomo, że wpływ leków na różne procesy metaboliczne, zależy w znacznym stopniu od zastosowanej dawki. Dla niektórych leków, określone efekty występują tylko przy zastosowaniu dużych, eksperymentalnych dawek, natomiast nie stwierdza się ich dla niskich dawek [50, 51]. Jak podano powyżej, przeprowadzone do tej pory badania *in vivo* dotyczące wpływu fenofibratu i bezafibratu na kompleks BCKDH, wykonałam z zastosowaniem tylko jednego, wysokiego poziomu dawkowania. Dlatego też, po uzyskaniu stopnia doktora rozpoczęłam eksperymenty dotyczące oceny wpływu niskich, terapeutycznych [52, 53], dawek fenofibratu i bezafibratu na aktywność kompleksu BCKDH w wątrobie szczurów żywionych paszą z ograniczoną zawartością białka. Początkowo badałam zależność dawka-efekt, rozpoczynając w ten sposób cykl eksperymentów opisanych w publikacjach włączonych następnie do cyklu prac habilitacyjnych.

3.3.2. Cel i zakres prowadzonych badań

Celem moich badań naukowych, których efektem jest cykl publikacji składający się na „osiągnięcie habilitacyjne”, była ocena wpływu *in vivo* określonych leków hipolipemicznych (fenofibratu, bezafibratu i simwastatyny) na aktywność dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (BCKDH) oraz dehydrogenazy 2-oksoglutaranu (2-OGDH), należących do rodziny dehydrogenaz 2-oksokwasów; z uwzględnieniem analizy wybranych aspektów mechanizmu działania tych leków na wymienione kompleksy.

Przedstawiony powyżej cel został zrealizowany przez przeprowadzenie badań, w obrębie których można wyróżnić trzy obszary [P1-P4]:

- ocena działania niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego (karmionych dietą zawierającą 8% białka) [P1 i P2].
- analiza wpływu simwastatyny na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą o zróżnicowanej zawartości białka (dietą standardową-23% białka i niskobiałkową-8% białka) [P3].
- ocena działania niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu 2-OGDH w tkance wątrobowej szczurów, które żywiono paszą niskobiałkową (8% białka) [P4].

Opublikowano także pracę przeglądową [P5] przedstawiającą współczesne poglądy na funkcje BCAAs oraz metabolizm tych aminokwasów. Zasadniczą część tej pracy stanowi omówienie wyników badań dotyczących wpływu wybranych leków hipolipemicznych z grupy fibratów i statyn na katabolizm BCAAs.

3.3.3. Omówienie wyników przeprowadzonych badań

3.3.3.1. Wpływ niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego [P1-P2].

Zastosowano model badawczy, w którym użyto szczurów płci męskiej, rasy Wistar, żywionych paszą niskobiałkową (8% białka), otrzymujących przez okres 14 dni wzrastające dawki fenofibratu (5,10,20 i 50 mg/kg m.c) lub bezafibratu (5,10 i 20 mg/kg m.c) bądź roztwór rozpuszczalnika (0,3 % metylocelulozy) podawanych raz dziennie (dożładowo).

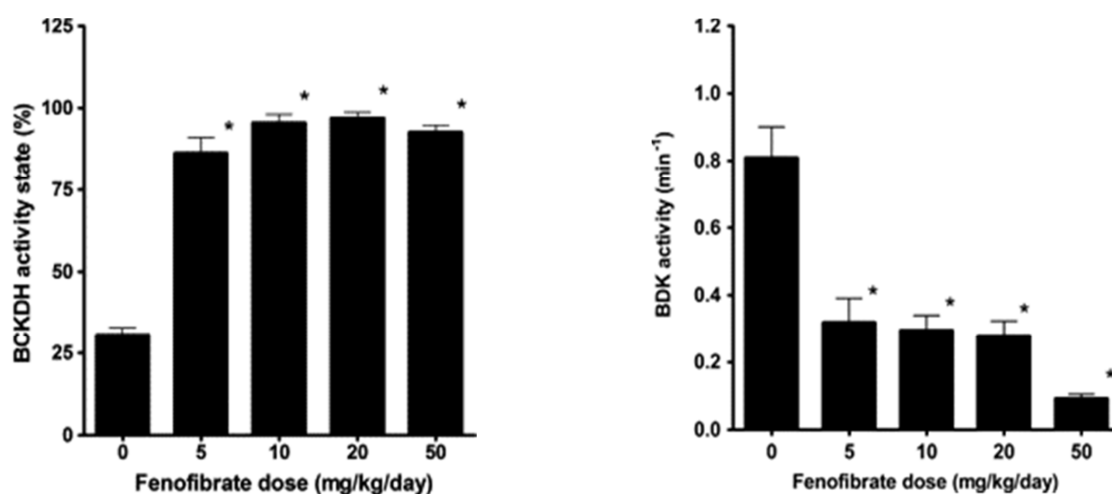
Analizy przeprowadzone w zakresie tego tematu obejmowały:

- izolację kompleksu BCKDH z tkanki wątrobowej szczurów oraz pomiar aktywności aktualnej oraz całkowitej BCKDH, przy zastosowaniu kinetycznej metody spektrofotometrycznej, a następnie wyliczenie stanu aktywności katalitycznej tego kompleksu [P1 i P2].
- oznaczenie aktywności katalitycznej oraz ilości białka enzymatycznego (przy zastosowaniu techniki Western blot z użyciem specyficznych przeciwciał) dla kinazy kompleksu BCKDH (BDK) [P1].
- oznaczenie poziomu mRNA dla składowych katalitycznych kompleksu BCKDH – podjednostka E1 α , E1 β i E2, a także enzymów regulatorowych BDK oraz BDP z wykorzystaniem techniki RT-PCR (*ang.* reverse transcription-PCR) [P2].

Celem pracy **P1** (Knapik-Czajka M, Gozdzińska A, Jaskiewicz J. *Adverse effect of fenofibrate on branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in rat liver. Toxicology*, 2009, 266, 1-5) była ocena wpływu fenofibratu stosowanego w dawkach 5,10,20 i 50 mg/kg m.c, na aktywność kompleksu BCKDH w wątrobie szczurów żywionych paszą niskobiałkową (8% białka).

Fenofibrat powodował zmniejszenie aktywności BDK, w zależności dawka-efekt (o 61%, 64%, 66% i 89%; $p < 0.0001$ w stosunku do grupy kontrolnej), natomiast nie miał wpływu na ilość białka enzymatycznego. Na podstawie tych wyników wysnuto przypuszczenie, że fenofibrat hamuje aktywność BDK na poziomie potranslacyjnym.

Fenofibrat jest strukturalnym analogiem kłofibratu, którego aktywny metabolit, kwas kłofibrowy wykazuje strukturalne podobieństwo do α -ketoizokapronianu (KIC). Z kolei ten ostatni związek, będący produktem transaminacji leucyny, jest endogennym, allosterycznym inhibitorem BDK [26, 27]. W konsekwencji zmniejszonej aktywności BDK, przeważa działanie BDP i dochodzi do ograniczenia fosforylacji BCKDH oraz zwiększenia aktywności kompleksu. U szczurów otrzymujących fenofibrat następował dawkozależny wzrost stanu aktywności BCKDH (był 2.8 ± 0.2 , 3.1 ± 0.1 , 3.2 ± 0.1 i 3.0 ± 0.1 razy wyższy w stosunku do grupy kontrolnej; $p < 0.0001$). Obserwowano także zwiększenie aktywności aktualnej (była o 3.7 ± 0.3 , 4.1 ± 0.1 , 4.6 ± 0.3 i 4.0 ± 0.3 razy wyższa w stosunku do grupy kontrolnej; $p < 0.0001$) oraz całkowitej BCKDH (była 1.3 ± 0.1 , 1.3 ± 0.1 , 1.5 ± 0.1 i 1.3 ± 0.1 razy wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej; $p < 0,001$). Stwierdzono również, znany wcześniej dla dużych eksperymentalnych dawek fenofibratu, efekt hepatomegalii, w odpowiedzi na podanie tego leku w dawce ≥ 10 mg/kg m. c. [P1].

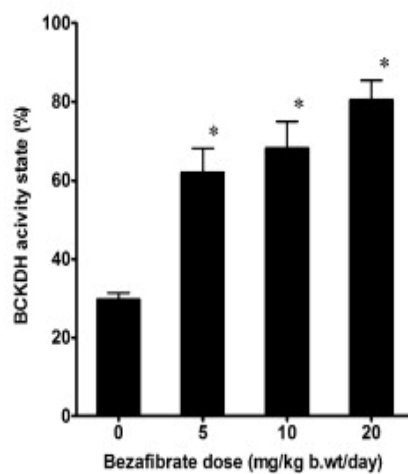


Ryc. 4 Wpływ wzrastających dawek fenofibratu na stan aktywności kompleksu BCKDH oraz aktywność enzymu regulatorowego, BDK w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą niskobiałkową (8% białka); (* $p < 0,0001$); [P1].

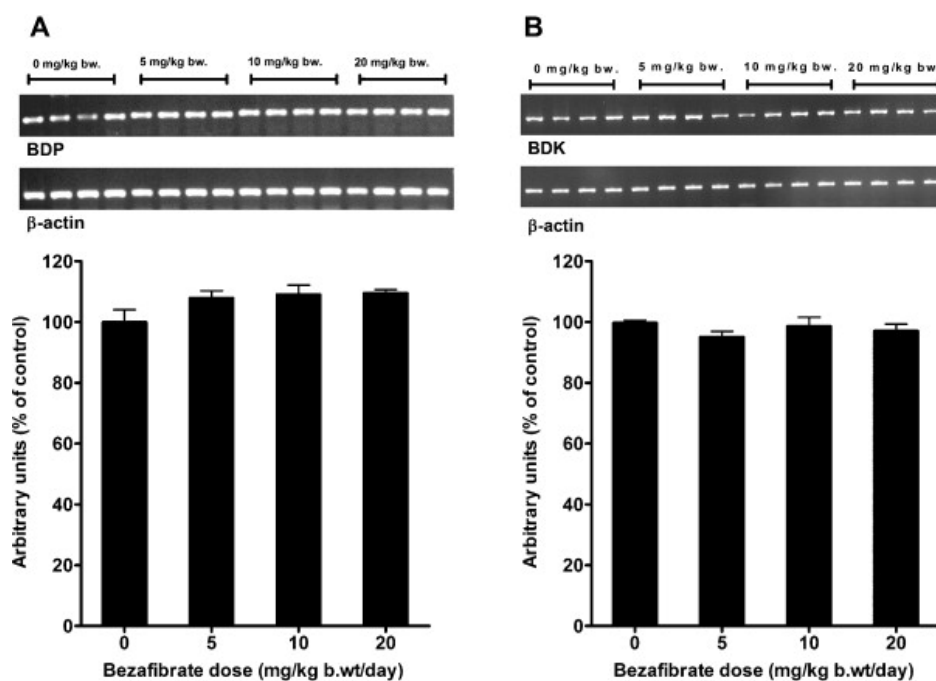
Ponieważ, jak podano powyżej, bezafibrat może wykazywać odmienny od fenofibratu wpływ na określone procesy metaboliczne, w kolejnej pracy P2 (Knapik-Czajka M. *Stimulation of rat liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase activity*

by low doses of bezafibrate. Toxicology 2013, 306, 101-107) przedstawiono wyniki badań, których celem była ocena działania bezafibratu stosowanego w dawkach (5,10 i 20 mg/kg m.c) na aktywność kompleksu BCKDH w wątrobie szczurów żywionych paszą niskobiałkową. Ze względu na wycofanie z rynku kluczowego dla oznaczeń BDK odczynnika, nie był możliwy pomiar aktywności tego enzymu regulatorowego. Równocześnie, po raz pierwszy oceniono wpływ fibratu (bezafibratu) na poziom mRNA dla BDP, która została zidentyfikowana jako specyficzna fosfataza, biorąca udział w regulacji aktywności BCKDH, dopiero w 2009 r. [24].

Wykazano, że bezafibrat zwiększa aktywność aktualną, całkowitą oraz stan aktywności kompleksu BCKDH w wątrobie szczurów żywionych paszą niskobiałkową. Obserwowany efekt był dawkozależny; stan aktywności BCKDH u zwierząt otrzymujących wzrastające dawki bezafibratu był o 2.1 ± 0.2 , 2.3 ± 0.2 i 2.7 ± 0.2 razy wyższy niż w grupie kontrolnej ($p < 0.01$) (Ryc.5). Zmiany aktywności kompleksu BCKDH nie były związane ze zmianami poziomu mRNA dla podjednostek katalitycznych i/lub regulatorowych (Ryc. 6). Takie wyniki wskazują na zmniejszenie przez bezafibrat stopnia ufosforylowania kompleksu BCKDH, prawdopodobnie poprzez bezpośrednie działanie hamujące na aktywność BDK (wstępne, nieopublikowane dane). Nie można również wykluczyć wpływu bezafibratu na proces wiązania enzymów regulatorowych (BDK lub/i BDP) z kompleksem BCKDH. Obserwowano także, że bezafibrat stosowany w największej dawce (20 mg/kg m.ciała) wywoływał hepatomegalię u zwierząt [P2].



Ryc. 5 Wpływ bezafibratu na stan aktywności kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą niskobiałkową (8% białka); (* $p < 0,01$); [P2].



Ryc. 6 Wpływ bezafibratu na poziom mRNA dla BDP (A) oraz BDK (B), w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą niskobiałkową (8% białka); [P2].

Na podstawie wyników prac **P1 i P2** można stwierdzić, że w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą niskobiałkową, fenofibrat i bezafibrat, stosowane w niskich dawkach, poprzez zmniejszenie fosforylacji kompleksu powodują wzrost aktywności BCKDH. Badane fibraty zaburzają więc fizjologiczną adaptację kompleksu do ograniczonej dostępności białka pokarmowego. Wiadomo, że nadmierna aktywność BCKDH skutkuje przyspieszeniem katabolizmu BCAAs w wątrobie i spadkiem stężenia tych aminokwasów w osoczu, nawet o 30-50% [41, 45]. Można więc sądzić, że w tych warunkach następuje ograniczenie dostępności BCAAs dla mięśni szkieletowych, co wiąże się z zaburzeniem metabolizmu miocytów, w tym równowagi między syntezą a degradacją białek mięśniowych. W konsekwencji może dochodzić do zaburzenia funkcjonowania tej tkanki. Można także przypuszczać, że niepożądany wpływ fibratów na katabolizm BCAAs jest jednym z czynników patomechanizmu działań niepożądanych ze strony mięśni szkieletowych, obserwowanych u ludzi i zwierząt eksperymentalnych podczas stosowania tych leków.

3.3.3.2. Wpływ simwastatyny na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów w tkance wątrobowej szczurów w warunkach prawidłowej oraz ograniczonej podaży białka pokarmowego [P3].

Wyniki prac **P1 i P2** skłoniły mnie do podjęcia tematu oceny wpływu innych niż fibraty, leków hipolipemicznych, na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów. Najczęściej stosowaną na świecie w terapii zaburzeń lipidowych grupą leków są statyny, w tym lipofilna simwastatyna. Jak wiadomo, statyny ograniczają syntezę cholesterolu (poprzez hamowanie reduktazy HMG-CoA), co prowadzi do zwiększenia ilości receptorów dla frakcji LDL i nasilenia pobierania tej frakcji z osocza do wnętrza komórek. Takie działanie skutkuje obniżeniem stężenia aterogennej frakcji LDL w osoczu krwi. Ponadto, statyny zwiększają poziom cholesterolu HDL oraz redukują stężenie TG w osoczu krwi. Związki te wykazują też szereg korzystnych efektów pozalipidowych, przyczyniających się do ograniczenia rozwoju miażdżycy, a w konsekwencji do zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Do efektów tych należą na przykład: ochronny wpływ na śródbłonek naczyniowy, zmniejszenie nasilenia stresu

oksydacyjnego oraz działanie przeciwzapalne. Ponadto, statyny korzystnie modyfikują procesy krzepnięcia, a także stabilizują blaszkę miażdżycową [54]. Podobnie jak w przypadku fibratów, podczas terapii statynami (szczególnie lipofilnymi) mogą występować objawy miopatii. Stwierdzono też, że określone czynniki np. forsowne ćwiczenia fizyczne lub nadmierne spożywanie alkoholu, bądź równoczesne przyjmowanie leków, które są inhibitorami lub substratami dla cytochromu P-450, mogą dodatkowo zwiększać ryzyko występowania miopatii w trakcie leczenia tymi lekami [55, 56].

Dotychczas nie wykonano badań dla oceny wpływu statyn na metabolizm BCAAs. Biorąc pod uwagę wpływ fibratów na kompleks BCKDH oraz fakt występowania objawów miopatii, zarówno w trakcie terapii fibratami jak i statynami, wysnułam przypuszczenie, że simwastatyna modyfikuje aktywność kompleksu BCKDH, szczególnie w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego.

Dla sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono badania opisane w pracy **P3** (Knapik-Czajka M. *Simvastatin increases liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity in rats fed with low-protein diet. Toxicology 2014, 325, 107-114*), w których zastosowano model eksperymentalny z użyciem szczurów płci męskiej, rasy Wistar, żywionych przez okres 14 dni paszą o zróżnicowanej zawartości białka: standardową (23% białka) lub niskobiałkową (8% białka). Zwierzętom karmionym odpowiednią dietą podawano raz dziennie (dożłódkowo) simwastatinę w dawce 80 mg/kg m.c (grupy badane) lub roztwór rozpuszczalnika (0,3 % metylocelulozy-grupy kontrolne). Wyboru dawki dokonano uwzględniając wyniki uzyskane przez Mallinson i wsp. (2009) [57], którzy wykazali, że simwastatyna w dawce 80 mg/kg m.c powoduje wzrost poziomu mRNA dla kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (*ang.* pyruvate dehydrogenase kinase, PDK), enzymu regulatorowego kompleksu PDH. Ten ostatni kompleks, podobnie jak BCKDH i 2-OGDH, należy do rodziny mitochondrialnych dehydrogenaz 2-oksokwasów.

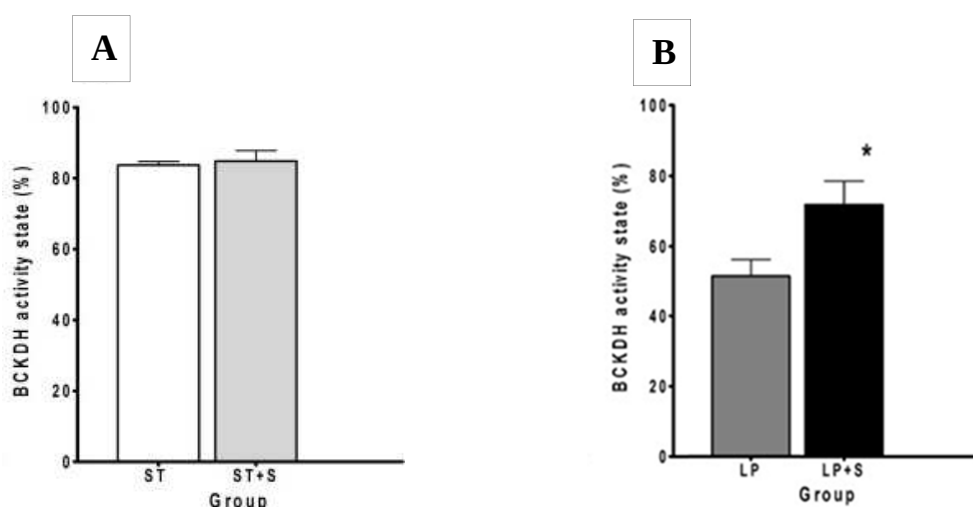
Analizy przeprowadzone w zakresie tego tematu obejmowały:

-izolację kompleksu BCKDH z tkanki wątrobowej szczurów oraz pomiar aktywności aktualnej oraz całkowitej BCKDH przy zastosowaniu kinetycznej metody spektrofotometrycznej, a następnie wyliczenie stanu aktywności katalitycznej tego kompleksu [**P3**].

- oznaczenie poziomu mRNA dla składowych katalitycznych kompleksu BCKDH – podjednostki E1 α , E1 β i E2, a także enzymów regulatorowych BDK i BDP z zastosowaniem techniki RT-PCR (*ang.* reverse transcription-PCR) [P3].

Potwierdzono, że fizjologiczna adaptacja ustroju do ograniczonej podaży białka w diecie, polega na zmniejszeniu stanu aktywności kompleksu BCKDH w wątrobie i ograniczeniu katabolizmu BCAAs. U zwierząt żywionych paszą niskobiałkową, simwastatyna powodowała wzrost aktywności aktualnej BCKDH, nie miała wpływu na aktywność całkowitą oraz istotnie zwiększała stan aktywności kompleksu (o 39% porównując do grupy kontrolnej; $p < 0,05$) (Ryc. 7B). Wykazano, że zmiana aktywności kompleksu nie była związana z wzrostem poziomu mRNA, dla podjednostek katalitycznych (E1 α , E1 β , E2) i/lub enzymów regulatorowych (BDK i BDP). U zwierząt karmionych paszą standardową nie stwierdzono istotnego wpływu simwastatyny na aktywność kompleksu BCKDH (Ryc. 7A) oraz poziom mRNA dla podjednostek katalitycznych i/lub regulatorowych w tkance wątrobowej.

Uzyskane wyniki wskazują na modyfikację przez simwastatynę aktywności BCKDH, poprzez ograniczenie fosforylacji kompleksu [P3]. Możliwe jest, że u szczurów żywionych paszą niskobiałkową simwastatyna ogranicza fosforylację BCKDH poprzez pośredni wpływ na aktywność BDK. Związek ten zwiększa bowiem poziom KIC w osoczu krwi [58]. Wysokie stężenie KIC hamuje BDK i ogranicza wiązanie tego enzymu do BCKDH, co prowadzi do nasilenia defosforylacji i wzrostu aktywności kompleksu. Z kolei u zwierząt żywionych paszą standardową poziom KIC jest wysoki; dlatego aktywność BDK i ilość tego enzymu związana z kompleksem BCKDH są niewielkie. W tych warunkach dominuje aktywność BDP. Można więc przypuszczać, że dalszy wzrost poziomu KIC indukowany przez simwastatynę, nie ma istotnego wpływu na stan fosforylacji kompleksu BCKDH.



Ryc. 7 Wpływ simwastatyny na stan aktywności kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową (23% białka) (A) i niskobiałkową (8% białka) (B); (* $p < 0,05$) [P3].

Na poziomie molekularnym statyny hamują reduktazę HMG-CoA (na etapie syntezy mewalonianu z HMG-CoA) [59]. W konsekwencji zahamowana jest synteza nie tylko cholesterolu, ale również jednostek izoprenoidowych, pełniących ważną rolę w modyfikacji potranslacyjnej (prenylacji) wielu białek funkcjonalnych. Nie można wykluczyć, że simwastatyna nasila defosforylację BCKDH poprzez ograniczenie prenylacji nie zidentyfikowanego dotychczas białka, które reguluje aktywność BDK i/lub BDP bądź wiązanie się tych enzymów z kompleksem.

Podsumowując, efekt działania simwastatyny (w dawce 80 mg/kg m.c) na kompleks BCKDH w wątrobie szczurów zależy od zawartości białka pokarmowego. Simwastatyna nie wykazuje wpływu na kompleks BCKDH w warunkach pełnej dostępności białka pokarmowego. Natomiast podawana szczurom żywionym dietą niskobiałkową, poprzez zwiększenie aktywności BCKDH, zaburza fizjologiczną adaptację kompleksu do ograniczonej podaży białka [P3]. Podobnie jak w przypadku fibratów, nie można wykluczyć, że w warunkach niedoboru pokarmowego nasilony katabolizm BCAAs w wątrobie jest jednym z czynników patomechanizmu miopatii. Chociaż nie wykonano szczegółowych badań dla oceny metabolizmu mięśni szkieletowych szczurów, to jednak w

trakcie eksperymentu obserwowano objawy miopatii u zwierząt laboratoryjnych żywionych paszą niskobiałkową i otrzymujących simwastatynę. Nie stwierdzono objawów zaburzenia funkcji mięśni u szczurów karmionych paszą standardową, którym podawano ten związek.

3.3.3.3. Wpływ niskich dawek bezafibratu i fenofibratu na aktywność kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranu w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej podaży białka pokarmowego [P4].

2-OGDH katalizuje reakcję dekarboksylacji tlenowej 2-oksoglutaranu (2-OG, nazywanego też α -ketoglutaranem, 2-KG) do bursztynylo-CoA. Kompleks 2-OGDH składa się z powtarzalnych kopii dehydrogenazy 2-oksoglutaranu (składowa E1), transferazy sukcynylo-dihydrolipoamidowej (składowa E2) i dehydrogenazy dihydrolipoamidowej (składowa E3). Ostatnio wykazano, że w skład 2-OGDH wchodzi również podjednostka Kgd 4, która jest niezbędna dla utrzymania stabilności kompleksu [60].

2-OGDH pełni szereg istotnych funkcji w komórkach. Jako kluczowy enzym cyklu Krebsa bierze udział w metabolizmie energetycznym. Ponadto, kompleks ten uczestniczy w sukcyinylacji białek, będącej jednym z mechanizmów przekazywania informacji w komórce [61]. Stwierdzono również, że aktywność 2-OGDH determinuje metabolizm glutaminianu [62]. Poprzez wpływ na stężenie 2-oksoglutaranu kompleks 2-OGDH reguluje także szybkość glukoneogenezy w komórkach wątrobowych [63].

Aktywność 2-OGDH jest kontrolowana głównie poprzez mechanizm allosteryczny. Kompleks 2-OGDH jest hamowany przez wzrost wartości stosunku stężeń bursztynylo-CoA/CoA oraz NADH/NAD [64, 65]. Aktywność 2-OGDH zmienia się również w zależności od stanu energetycznego komórki; przy wzroście wartości stosunku ATP/ADP następuje spadek aktywności kompleksu. Wpływ na aktywność 2-OGDH mają też jony metali, głównie wapnia i magnezu [66]. Regulacji podlega również ekspresja genów dla podjednostek katalitycznych kompleksu 2-OGDH, jednak badania na ten temat są ograniczone [67]. Przyjmuje się powszechnie, że w odróżnieniu od kompleksów BCKDH i PDH aktywność 2-OGDH nie jest kontrolowana na zasadzie odwracalnej fosforylacji. Jednak wyniki ostatnich badań wskazują na możliwość regulacji tego kompleksu poprzez fosforylację, chociaż mechanizm tego procesu nie został jeszcze wyjaśniony [68, 69].

Prager i wsp. [70] dowiedli, że klofibrat modyfikuje aktywność 2-OGDH w tkance wątrobowej szczurów. Dodatek klofibratu do paszy w ilości 0,75% (co, jak podają autorzy, odpowiada w przybliżeniu dawce 248 ± 47 mg na szczura o masie 140-190g) przez okres 3 tygodni powoduje istotny wzrost aktywności tego kompleksu.

Uwzględniając wyniki badań przeprowadzonych przez Prager i wsp., [70], a także badań własnych opisanych w publikacjach **P1** i **P2**, jak również podobieństwo strukturalne oraz funkcjonalne dehydrogenaz 2-oksokwasów, postanowiłam podjąć temat wpływu niskich dawek fibratów na aktywność kompleksu 2-OGDH w tkance wątrobowej szczurów żywionych paszą niskobiałkową (praca **P4** - Knapik-Czajka M. *Effect of low doses of bezafibrate and fenofibrate on liver 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in low-protein diet fed rats. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2015, 10, 505-512*).

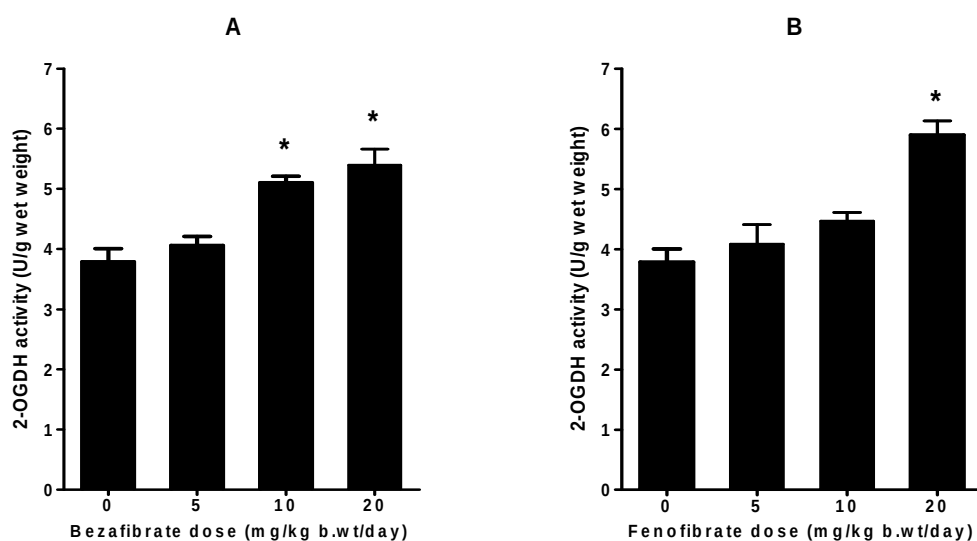
Nakajima i wsp. [52] udowodnili, że bezafibrat obniża poziom TG w osoczu krwi, jednak mechanizm działania zależy od zastosowanej dawki. W niskiej, terapeutycznej dawce bezafibrat obniżał poziom TG w sposób niezależny od receptorów PPAR α , natomiast w dużej, eksperymentalnej dawce, efekt ten był związany z wzrostem poziomu mRNA dla PPAR α . Dlatego postanowiłam też zbadać, czy ewentualny wpływ niskich dawek fibratów na kompleks 2-OGDH jest związany ze zmianą poziomu mRNA dla receptorów PPAR α .

Dla sprawdzenia powyższej hipotezy zastosowano model badawczy, użyty w pracach **P1** i **P2**, w którym szczurom płci męskiej, rasy Wistar, żywionym paszą niskobiałkową (8% białka), podawano (raz dziennie, dożołądkowo) przez okres 14 dni, fenofibrat lub bezafibrat (w dawkach 5,10 i 20 mg/kg m.c) bądź roztwór rozpuszczalnika (0,3 % metylocelulozy-grupa kontrolna).

Analizy przeprowadzone w zakresie tego tematu obejmowały:

- izolację kompleksu 2-OGDH z tkanki wątrobowej szczurów oraz pomiar aktywności kompleksu przy zastosowaniu kinetycznej metody spektrofotometrycznej [**P4**].
- oznaczenie poziomu mRNA dla składowych katalitycznych kompleksu 2-OGDH – podjednostek E1 i E2, a także dla receptorów PPAR α z zastosowaniem techniki RT-PCR (*ang.* reverse transcription-PCR) [**P4**].

Stwierdzono, że w wątrobie szczurów aktywność kompleksu 2-OGDH wzrastała pod wpływem bezafibratu (o 7, 35 i 42%) oraz fenofibratu (o 8,18 i 56%). Istotną statystycznie różnicę obserwowano dla bezafibratu w dawkach 10 i 20 mg/kg m.c oraz dla najwyższej dawki fenofibratu ($p<0,001$). Poziom mRNA dla podjednostek katalitycznych kompleksu (E1 i E2) nie różnił się pomiędzy grupami otrzymującymi fibraty a grupą kontrolną. Fibraty nie miały też wpływu na poziom mRNA dla receptorów PPAR α . Można przypuszczać, że fenofibrat i bezafibrat stosowane w niskich dawkach pobudzają aktywność kompleksu 2-OGDH i efekt ten nie jest związany ze zmianą poziomu mRNA dla PPAR α . Wykazano, że klofibrat wpływa na wartość stosunku stężeń bursztynilo-CoA/CoA oraz NADH/NAD $^{+}$ w komórkach wątroby, a także stężenie jonów wapnia [71, 72]. Można sądzić, że podobny wpływ mają fenofibrat i bezafibrat, które są analogami klofibratu. Biorąc pod uwagę kluczową rolę kompleksu 2-OGDH w metabolizmie nie można wykluczyć, że takie działanie badanych fibratów może prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu wątroby [P4].



Ryc. 8 Wpływ wzrastających dawek bezafibratu (A) i fenofibratu (B) na aktywność kompleksu 2-OGDH w wątrobie szczurów żywionych paszą niskobiałkową (8% białka); (* $p<0,001$); [P4].

3.3.4. Wpływ wybranych leków hipolipemicznych na metabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach [P5]

W pracy [P5] (Knapik-Czajka M. Wpływ wybranych leków hipolipemicznych na metabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. *Farmacja Polska* 2015, 71, 415-420.) przedstawiono współczesne poglądy na rolę BCAAs w ustroju oraz podsumowano wyniki kilkuletnich badań dotyczących oceny wpływu leków hipolipemicznych na aktywność BCKDH (prezentowanych w niniejszym autoreferacie). We wstępie opisano fizjologiczną rolę BCAAs, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji regulatorowych tych aminokwasów, oraz potencjalne zastosowanie BCAAs w terapii wybranych jednostek chorobowych. Następnie przedstawiono zarys katabolizmu BCAAs, oraz kluczową rolę kompleksu BCKDH w utrzymaniu homeostazy BCAAs. W dalszej części, opisano regulację katabolizmu BCAAs oraz omówiono wpływ bezafibratu i fenofibratu oraz simwastatyny na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów. Zaprezentowano również hipotezę, że zaburzenie katabolizmu BCAAs w wątrobie przez leki hipolipemiczne może być jednym z czynników patomechanizmu występowania działań niepożądanych ze strony mięśni szkieletowych. Przedstawiono też wniosek nasuwający się na podstawie uzyskanych wyników, że wystąpienie objawów miopatii podczas terapii tymi lekami może być w pewnym stopniu determinowane zawartością białka w diecie [P1-P3].

3.3.5. Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji

Monotematyczny cykl publikacji przedstawiony jako osiągnięcie naukowe do postępowania habilitacyjnego dotyczy oceny wpływu *in vivo* fenofibratu, bezafibratu (stosowanych w niskich, terapeutycznych dawkach) i simwastatyny, na aktywność dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (BCKDH) oraz dehydrogenazy 2-oksoglutaranu (2-OGDH); kompleksów enzymatycznych należących do dehydrogenaz 2-oksokwasów.

Na cykl ten składają się cztery prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa, opublikowane w latach 2009-2015, o łącznym wskaźniku *impact factor* wynoszącym 11,659; co odpowiada 112 pkt KBN/MNiSW.

Przedstawione w autoreferacie badania mają charakter nowatorski, ponieważ dotychczas w piśmiennictwie naukowym nie opisano wyników takich eksperymentów. Ponadto, wyniki tych badań stanowią cenne źródło informacji, rozszerzające obecną wiedzę na temat działania współcześnie stosowanych leków hipolipemicznych, na enzymy mitochondrialne, regulujące ważne procesy metaboliczne ustroju. Istotne znaczenie uzyskanych wyników wynika z faktu, że dotyczą one powszechnie stosowanej na świecie grupy leków oraz z faktu, że kompleksy enzymatyczne należące do dehydrogenaz 2-oksokwasów mają kluczowe znaczenie dla katabolizmu BCAAs oraz dla metabolizmu komórek wątrobowych, a w konsekwencji dla funkcjonowania całego ustroju.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że do najważniejszych osiągnięć i elementów nowości naukowej wynikających z przeprowadzonych badań zaliczam wykazanie:

- pobudzającego wpływu niskich dawek fenofibratu i bezafibratu na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej dostępności białka pokarmowego **[P1 i P2]**.

- hamującego wpływu fenofibratu w zależności dawka-efekt na aktywność kinazy kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (BDK), enzymu regulatorowego dla kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej dostępności białka pokarmowego **[P1]**.

- pobudzającego wpływu simwastatyny (w dawce 80 mg/kg m.ciała) na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej dostępności białka pokarmowego oraz stwierdzenie braku takiego działania przy pełnej dostępności białka pokarmowego **[P3]**.

- pobudzającego wpływu fenofibratu i bezafibratu stosowanych w niskich, dawkach, na aktywność katalityczną kompleksu 2-OGDH w tkance wątrobowej szczurów w warunkach ograniczonej dostępności białka pokarmowego **[P4]**.

Szczególnym osiągnięciem tych badań, było udowodnienie, przeciwnego do adaptacji fizjologicznej, działania niskich dawek fenofibratu i bezafibratu na aktywność kompleksu BCKDH w warunkach niedoboru białkowego **[P1 i P2]**.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki można przypuszczać, że jedną z przyczyn miopatii mięśni szkieletowych występującej podczas stosowania opisanych leków hipolipemicznych, w warunkach niedoboru białka pokarmowego, jest nasilenie

katabolizmu BCAAs w wątrobie, prowadzące do spadku stężenia tych aminokwasów w osoczu i ograniczenia ich dostępności dla mięśni, a w konsekwencji do zaburzenia funkcjonowania tej tkanki.

Uzyskane wyniki mogą mieć implikacje praktyczne, ponieważ na ich podstawie można domniemywać, że jednym z czynników zwiększających ryzyko wystąpienia miopatii podczas stosowania leków hipolipemicznych, jest niedobór białka w diecie. Konieczna jest jednak weryfikacja otrzymanych wyników w badaniach klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Yeaman SJ. The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: A complex family. Trends in Biochemical Sciences. 1986;11:293-6.
2. Wynn RM, Davie JR, Chuang DT. Structure, function and assembly of mammalian branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex. Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes. 1996:101-18.
3. Harris RA, Hawes JW, Popov KM, Zhao Y, Shimomura Y, Sato J, et al. Studies on the regulation of the mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase complexes and their kinases. Adv Enzyme Regul. 1997;37:271-93.
4. Zhou M, Lu G, Gao C, Wang Y, Sun H. Tissue-specific and nutrient regulation of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase phosphatase, protein phosphatase 2Cm (PP2Cm). J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23397-406.
5. Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. Annu Rev Nutr. 1984;4:409-54.
6. Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: Implications for establishing safe intakes. J Nutr. 2005 Jun;135(6 Suppl):1557S-64S.
7. Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. J Nutr. 2006 Feb;136(2):529S-32S.
8. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J Nutr. 2001 Mar;131(3):856S-60S.
9. Zanchi NE, Nicastro H, Lancha AH, Jr. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: Observations of in vitro and in vivo studies. Nutr Metab (Lond). 2008 Jul 17;5:20,7075-5-20.

10. Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 20;299(5):693-6.
11. Tajiri K, Shimizu Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 21;19(43):7620-9.
12. Huang Y, Zhou M, Sun H, Wang Y. Branched-chain amino acid metabolism in heart disease: An epiphenomenon or a real culprit? *Cardiovasc Res*. 2011 May 1;90(2):220-3.
13. van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, Wagenmakers AJ. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jul;72(1):96-105.
14. Fernstrom JD. Large neutral amino acids: Dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids*. 2013 Sep;45(3):419-30.
15. Mitsubuchi H, Owada M, Endo F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: An implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr*. 2005 Jun;135(6 Suppl):1565S-70S.
16. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: Enzyme and substrate regulation. *J Nutr*. 2006 Jan;136(1 Suppl):207S-11S.
17. Herman MA, She P, Peroni OD, Lynch CJ, Kahn BB. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem*. 2010 Apr 9;285(15):11348-56.
18. Iwasa M, Ishihara T, Mifuji-Moroka R, Fujita N, Kobayashi Y, Hasegawa H, et al. Elevation of branched-chain amino acid levels in diabetes and NAFL and changes with antidiabetic drug treatment. *Obes Res Clin Pract*. 2015 Jan 31.
19. Batch BC, Hyland K, Svetkey LP. Branch chain amino acids: Biomarkers of health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Jan;17(1):86-9.
20. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):448-53.
21. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr*. 2005 Jun;135(6 Suppl):1527S-30S.
22. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 9;313(2):391-6.
23. Harris RA, Paxton R, Powell SM, Goodwin GW, Kuntz MJ, Han AC. Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex by covalent modification. *Adv Enzyme Regul*. 1986;25:219-37.

24. Lu G, Sun H, She P, Youn JY, Warburton S, Ping P, et al. Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1678-87.
25. Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T, Harris RA. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: Nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001 Sep;4(5):419-23.
26. Han AC, Goodwin GW, Paxton R, Harris RA. Activation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase in isolated hepatocytes by branched-chain alpha-ketoacids. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Oct;258(1):85-94.
27. Tso SC, Qi X, Gui WJ, Chuang JL, Morlock LK, Wallace AL, et al. Structure-based design and mechanisms of allosteric inhibitors for mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 11;110(24):9728-33.
28. Zhao Y, Popov KM, Shimomura Y, Kedishvili NY, Jaskiewicz J, Kuntz MJ, et al. Effect of dietary protein on the liver content and subunit composition of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *Arch Biochem Biophys.* 1994 Feb 1;308(2):446-53.
29. Popov KM, Zhao Y, Shimomura Y, Jaskiewicz J, Kedishvili NY, Irwin J, et al. Dietary control and tissue specific expression of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Jan 10;316(1):148-54.
30. Harris RA, Goodwin GW, Paxton R, Dexter P, Powell SM, Zhang B, et al. Nutritional and hormonal regulation of the activity state of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;573:306-13.
31. Solomon M, Cook KG, Yeaman SJ. Effect of diet and starvation on the activity state of branched-chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex in rat liver and heart. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Dec 10;931(3):335-8.
32. Tenenbaum A, Klempfner R, Fisman EZ. Hypertriglyceridemia: A too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Dec 4;13(1):159,014-0159-y.
33. Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: Spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 Oct 11;11:125,2840-11-125.
34. Chapman MJ, Redfern JS, McGovern ME, Giral P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: Pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacol Ther.* 2010 Jun;126(3):314-45.
35. Chinetti-Gbaguidi G, Fruchart JC, Staels B. Pleiotropic effects of fibrates. *Curr Atheroscler Rep.* 2005 Sep;7(5):396-401.
36. Knapik-Czajka M, Goździalska A, Gawędzka A, Drąg J, Jaśkiewicz J. Jatrogenne miopatie indukowane wybranymi lekami hipolipemicznymi. *Farm Pol.* 2010;66:431-6.

37. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Molecular mechanism of action of the fibrates. *J Soc Biol.* 1999;193(1):67-75.
38. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: The bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol.* 2005 Sep 16;4:14.
39. Chanda D, Lee CH, Kim YH, Noh JR, Kim DK, Park JH, et al. Fenofibrate differentially regulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Hepatology.* 2009 Sep;50(3):880-92.
40. Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Hara A, Hu R, et al. Cholesterol-lowering effect of bezafibrate is independent of peroxisome proliferator-activated receptor activation in mice. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jul 1;76(1):108-19.
41. Ishiguro H, Katano Y, Nakano I, Ishigami M, Hayashi K, Honda T, et al. Clofibrate treatment promotes branched-chain amino acid catabolism and decreases the phosphorylation state of mTOR, eIF4E-BP1, and S6K1 in rat liver. *Life Sci.* 2006 Jul 17;79(8):737-43.
42. Kobayashi R, Murakami T, Obayashi M, Nakai N, Jaskiewicz J, Fujiwara Y, et al. Clofibrinic acid stimulates branched-chain amino acid catabolism by three mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 2002 Nov 15;407(2):231-40.
43. Ono K, Shioya H, Hakozaki M, Honda K, Mori T, Kochi H. Regulation by induction of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in clofibrate-fed rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Oct 15;172(1):243-8.
44. Paul HS, Liu WQ, Adibi SA. Alteration in gene expression of branched-chain keto acid dehydrogenase kinase but not in gene expression of its substrate in the liver of clofibrate-treated rats. *Biochem J.* 1996 Jul 15;317 (Pt 2)(Pt 2):411-7.
45. Kadota Y, Kazama S, Bajotto G, Kitaura Y, Shimomura Y. Clofibrate-induced reduction of plasma branched-chain amino acid concentrations impairs glucose tolerance in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012 May;36(3):337-43.
46. Wagenmakers AJ, Veerkamp JH, Schepens JT, van Moerkerk HT. Effect of clofibrate on branched-chain amino acid metabolism. *Biochem Pharmacol.* 1985 Jun 15;34(12):2169-73.
47. Knapik-Czajka M, Cyganek I, Tyszka-Czochara M, Francik R, Jaskiewicz J. Effect of fibrates on the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in rat liver. *Acta Poloniae Toxicologica.* 2002;10:191-8.
48. Knapik-Czajka M, Jaskiewicz J. The influence of fibrates on branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex expression in rat's liver. *Acta Toxicol.* 2003;11:67-73.
49. Knapik-Czajka M, Tyszka-Czochara M, Jaskiewicz J. Effect of fibrates on branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex activity. *Acta Toxicol.* 2003;11:59-65.

50. Hsu YJ, Wang LC, Yang WS, Yang CM, Yang CH. Effects of fenofibrate on adiponectin expression in retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2014;2014:540326.
51. Nakajima T, Tanaka N, Li G, Hu R, Kamijo Y, Hara A, et al. Effect of bezafibrate on hepatic oxidative stress: Comparison between conventional experimental doses and clinically-relevant doses in mice. *Redox Rep.* 2010;15(3):123-30.
52. Nakajima T, Tanaka N, Kanbe H, Hara A, Kamijo Y, Zhang X, et al. Bezafibrate at clinically relevant doses decreases serum/liver triglycerides via down-regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c in mice: A novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent mechanism. *Mol Pharmacol.* 2009 Apr;75(4):782-92.
53. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008 Mar;22(3):659-61.
54. Mihos CG, Pineda AM, Santana O. Cardiovascular effects of statins, beyond lipid-lowering properties. *Pharmacol Res.* 2014 Oct;88:12-9.
55. Sathasivam S, Lecky B. Statin induced myopathy. *BMJ.* 2008 Nov 6;337:a2286.
56. Tomlinson SS, Mangione KK. Potential adverse effects of statins on muscle. *Phys Ther.* 2005 May;85(5):459-65.
57. Mallinson JE, Constantin-Teodosiu D, Sidaway J, Westwood FR, Greenhaff PL. Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy. *J Physiol.* 2009 Jan 15;587(Pt 1):219-30.
58. Trupp M, Zhu H, Wikoff WR, Baillie RA, Zeng ZB, Karp PD, et al. Metabolomics reveals amino acids contribute to variation in response to simvastatin treatment. *PLoS One.* 2012;7(7):e38386.
59. Gazzerо P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: A critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev.* 2012 Jan;64(1):102-46.
60. Heublein M, Burguillos MA, Vogtle FN, Teixeira PF, Imhof A, Meisinger C, et al. The novel component Kgd4 recruits the E3 subunit to the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mol Biol Cell.* 2014 Nov 1;25(21):3342-9.
61. Gibson GE, Xu H, Chen HL, Chen W, Denton T, Zhang S. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines. *J Neurochem.* 2015 Mar 14.
62. Araujo WL, Trofimova L, Mkrtchyan G, Steinhäuser D, Krall L, Graf A, et al. On the role of the mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in amino acid metabolism. *Amino Acids.* 2013 Feb;44(2):683-700.

63. Titheradge MA, Picking RA, Haynes RC, Jr. Physiological concentrations of 2-oxoglutarate regulate the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver. *Biochem J.* 1992 Aug 1;285 (Pt 3):767-71.
64. McMinn CL, Ottaway JH. Studies on the mechanism and kinetics of the 2-oxoglutarate dehydrogenase system from pig heart. *Biochem J.* 1977 Mar 1;161(3):569-81.
65. Smith CM, Bryla J, Williamson JR. Regulation of mitochondrial alpha-ketoglutarate metabolism by product inhibition at alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1974 Mar 10;249(5):1497-505.
66. Denton RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1309-16.
67. Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson T, Kim H, et al. Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem.* 2004 May 21;279(21):22092-101.
68. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 2010 Jun 11;106(11):1681-91.
69. Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J Biol Chem.* 2006 May 5;281(18):12300-7.
70. Prager C, Schon HJ, Nikfardjam M, Schmid D, Untersalmberger M, Kremser K, et al. Clofibrate elevates enzyme activities of the tricarboxylic acid cycle in rat liver. *J Lipid Res.* 1993 Mar;34(3):359-64.
71. Ball MR, Gumaa KA, McLean P. Effect of clofibrate on the CoA thioester profile in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979 Mar 30;87(2):489-96.
72. Jiao HL, Zhao BL. Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002 Dec 15;185(3):172-9.

4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

4.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Od początku zatrudnienia w Katedrze Toksykologii Collegium Medicum UJ zostałam czasowo oddelegowana do Pracowni Gastroenterologii I Katedry Chirurgii Ogólnej UJCM gdzie w latach 1991-1996 pracowałam pod kierunkiem Pani Prof.dr hab.med Haliny Szafran. Ze względu na istniejące wówczas warunki nie miałam możliwości wykonywania prac eksperymentalnych. Moja aktywność naukowa

koncentrowała się na zagadnieniach teoretycznych związanych z gospodarką lipidową organizmu człowieka. Efektem tej pracy były 4 publikacje przeglądowe, z których pierwsza dotyczyła charakterystyki i funkcji apolipoprotein w organizmie człowieka (załącznik 3 część II, pkt. D18). W kolejnych 3 publikacjach (2 z nich opublikowano w 1999 r.) przedstawiono dane na temat regulacji uwalniania kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej do osocza krwi u człowieka przez różne hormony: insulinę, glukagon i katecholoaminy; hormon wzrostu i kortyzol, a także hormony tarczycy i płciowe (załącznik 3 część II, pkt. D14, 15, 17).

Z tego okresu pochodzi też podręcznik, szczegółowo opisujący podstawy przemiany lipidowej organizmu człowieka, którego jestem współautorem (załącznik 3 część II, pkt. D19).

W latach 1996-1997 po zakończeniu oddelegowania, pracowałam w Katedrze Toksykologii Collegium Medicum i kontynuowałam swoje zainteresowania zagadnieniami gospodarki lipidowej. W tym okresie opublikowałam pracę przedstawiającą rolę wybranych antyoksydantów pokarmowych w ochronie frakcji LDL przed utlenieniem (załącznik 3 część II, pkt. D16).

Od 1.10.1997r. rozpoczęłam pracę w nowo utworzonym na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakładzie Analityki Biochemicznej. Głównym kierunkiem moich badań prowadzonych w tym okresie było określenie wpływu fibratów (przy zastosowaniu jednego, wysokiego poziomu dawkowania) na aktywność kompleksu BCKDH w tkance wątrobowej szczurów. Wyniki tych badań, dowodzące niepożądanego działania fibratów na kompleks BCKDH, stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej. Wyniki te zostały opublikowane już po obronie pracy doktorskiej (załącznik 3 część II, pkt. D9,10,13).

Innym kierunkiem mojej aktywności naukowej, było współuczestnictwo w pracach zespołu przeprowadzającego eksperymenty (w ramach projektu naukowego „Wpływ wybranych fibratów na mitochondrialne kompleksy enzymatyczne.”, załącznik 3 część II, pkt. I4) mające na celu ocenę działania fibratów na aktywność kompleksu PDH w wątrobie szczurów żywionych paszą wysokowęglowodanową. Stwierdzono, że bezafibrat i fenofibrat dodawane do paszy w ilości 0,5%, powodowały nasilenie aktywności kinazy

(PDK) katalizującej fosforylację kompleksu PDH, co było działaniem przeciwnym do regulacji fizjologicznej aktywności tego kompleksu (załącznik 3 część II, pkt. D8, 11).

4.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych konsekwentnie kontynuowałam badania nad problematyką będącą przedmiotem moich wcześniejszych zainteresowań naukowych, a dotyczącą oceny wpływu leków hipolipemicznych na aktywność kompleksu BCKDH (część eksperymentów wykonano w ramach projektu „Badania molekularnego mechanizmu działania fibratów na aktywność kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase-BCKDH) w zależności dawka-efekt.”, załącznik 3, część II, pkt.I3). Następnie podjęłam badania dla oceny działania fibratów na aktywność kompleksu 2-OGDH, a także wpływu simwastatyny na aktywność kompleksu BCKDH. Wyniki tych badań przedstawiono w cyklu publikacji stanowiących podstawę do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego (załącznik 3 część I, pkt.B).

Zagadnienie występowania działań niepożądanych ze strony mięśni szkieletowych w trakcie stosowania fibratów i statyn opisuje publikacja przeglądowa (nie włączona do cyklu prac habilitacyjnych) na temat jatrogennych miopatii indukowanych lekami hipolipemicznymi (załącznik 3 część II, pkt. D3), której jestem pierwszym autorem. W pracy omówiono postaci kliniczne miopatii, czynniki ryzyka występowania tego typu zaburzeń oraz opisano wyniki badań, dotyczących zaburzeń molekularnych prowadzących do wystąpienia miopatii w trakcie leczenia lekami hipolipemicznymi.

Z tematyką fibratów i ich wykorzystania terapeutycznego związana jest również publikacja przeglądowa prezentująca zastosowanie fibratów we współczesnej terapii cukrzycy (załącznik 3 część II, pkt. D1).

Najbardziej istotnym etapem w moim rozwoju naukowym po uzyskaniu stopnia doktora był udział (w latach 2005-2009) w ADNI 1 (Alzheimers Disease Neuroimagnetic Initiative 1), największym na świecie międzynarodowym projekcie naukowym, w którym zaangażowane było ponad 50 ośrodków naukowych i klinicznych (załącznik 3 część II, pkt. I1). W tym okresie pracowałam w Biomarker Research Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, School of Medicine,

Philadelphia PA, USA. Głównym celem projektu było opracowanie nowoczesnych metod diagnostycznych dla wczesnego rozpoznania, a także monitorowania rozwoju choroby Alzheimera. Byłam odpowiedzialna za analizę stężenia biomarkerów białkowych płynu mózgowo-rdzeniowego (amyloid β_{1-42} , białko Tau całkowite i ufosforylowane, p-Tau₁₈₁) przy użyciu testu immunologicznego INNO-BIA AlzBio3 (Innogenetics, Ghent, Belgia obecnie Fujirebio Europe) wykorzystującego technikę multipleksowej analizy stężenia białek, bazującą na pomiarze w czasie rzeczywistym fluorescencji mikrosfer polistyrenowych znakowanych przeciwciałami (xMAP® Technology, Luminex platform).

Początkowo przeprowadzono walidację testu oraz dokonano standaryzacji międzylaboratoryjnej oznaczeń (obejmującej 7 laboratoriów). Wykazano też przydatność tego testu dla oceny ryzyka progresji łagodnych zaburzeń poznawczych w chorobę Alzheimera i wyznaczono diagnostyczne wartości odcięcia dla tych markerów. Scharakteryzowano również czynniki przedanalityczne wpływające na oznaczenia tych białek (załącznik 3 część II, pkt. A3).

Następnie wykonano analizę stężenia amyloidu β_{1-42} , białka Tau p-Tau₁₈₁ w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z autopsyjnie potwierdzoną chorobą Alzheimera i osób odpowiedniej grupy kontrolnej oraz określono charakterystyczny dla choroby Alzheimera profil zmian poziomu tych markerów. Profil ten potwierdzono następnie u uczestników badania ADNI1; pacjentów z łagodną postacią choroby Alzheimera, z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (*ang.* mild cognitive impairment-MCI) oraz zdrowych, starszych osób (grupa kontrolna). Uzyskane wyniki wskazują, że amyloid β_{1-42} i białko Tau są charakterystycznymi markerami choroby Alzheimera. Markery te mają istotną wartość predykcyjną dla konwersji MCI w chorobę Alzheimera. Wykazano też, że istnieje korelacja między stężeniem tych białek a ilością alleli *APOε4* u ludzi (załącznik 3 część II, pkt. A4).

Ponadto uczestniczyłam w badaniach, w których wykazano korelację pomiędzy wynikami oznaczeń biomarkerów białkowych płynu mózgowo-rdzeniowego uzyskanymi przy pomocy testu INNO-BIA AlzBio3 i stosowaną powszechnie dla oznaczeń tych parametrów metodą ELISA (załącznik 3 część II, pkt. A2).

Głównym osiągnięciem badań prowadzonych w zakresie projektu ADNI1 było opracowanie „CSF biomarker signature of Alzheimer’s disease”, który może umożliwić

wczesne rozpoznanie choroby Alzheimera (jeszcze na etapie przedklinicznym) oraz wczesne prognozowanie konwersji łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI) w chorobę Alzheimera. Zastosowanie tych biomarkerów pozwala też na zintensyfikowanie badań mających na celu zidentyfikowanie nowych związków jako potencjalnych leków stosowanych w chorobie Alzheimera.

Wyniki badań prowadzonych w ramach projektu ADNI 1 zostały opublikowane w najbardziej prestiżowych czasopismach z dziedziny Neurologii Klinicznej (załącznik 3 część II, pkt. A2,3,4) oraz były prezentowane na konferencjach międzynarodowych (załącznik 3 część III, pkt. B1,2,4,5), a także zamieszczone w internetowej bazie danych projektu ADNI1.

Pracując w Biomarker Research Laboratory, brałam również udział w oznaczaniu stężeń biomarkerów białkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym u osób z idiopatycznym wodogłowie normotensyjnym (załącznik 3 część III, pkt. B3), a także witamin rozpuszczalnych w tłuszczach oraz poziomu leków immunosupresyjnych przy użyciu techniki HPLC-MS/MS.

Z tematyką choroby Alzheimera związana jest też praca przedstawiająca znaczenie biomarkerów białkowych w diagnostyce choroby Alzheimera, którą opublikowałam już po powrocie do Polski (załącznik 3 część II, pkt. D4).

Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowych był udział w badaniu klinicznym mającym na celu wykrycie ewentualnych powiązań pomiędzy rozwojem zaburzeń tkanki kostnej manifestujących się w postaci skoliozy idiopatycznej, a procesem dojrzewania płciowego. Badania te prowadzono we współpracy z Katedrą i Kliniką Ortopedii i Rehabilitacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zakopanym w ramach projektu naukowego „Badania nad etiologią i markerami bocznych idiopatycznych skrzywień kręgosłupa.”, załącznik 3 część II, pkt. I2. W zamierzeniu projektu było również udowodnienie, że jednym z czynników patogennych rozwoju tego schorzenia może być niedobór witaminy D jako następstwo nieprawidłowego wydzielania estrogenów. Do badań włączono dziewczęta, ze skoliozą idiopatyczną w okresie przed i po wystąpieniu menarche. Grupy kontrolne stanowiły dziewczęta w analogicznym wieku i zaawansowaniu dojrzałości płciowej, u których nie stwierdzono żadnych zaburzeń metabolicznych i deformacji kręgosłupa. Analizowano poziom wybranych hormonów oraz

markerów stanu metabolicznego tkanki kostnej oraz stężenie witaminy D. Uzyskane wyniki wykazały związek między stężeniem estradiolu w osoczu krwi a rozwojem skoliozy idiopatycznej i wskazały na możliwość wykorzystania oznaczeń poziomu estradiolu dla poszerzenia diagnostyki tego schorzenia (załącznik 3 część II, pkt. A1). Ponadto stwierdzono zależność między niskim stężeniem kalcytoniny oraz witaminy D w osoczu krwi a rozwojem skoliozy (manuskrypt po wstępnych recenzjach).

Istotną formą mojej aktywności naukowej od początku zatrudnienia na Wydziale Farmaceutycznym był także aktywny udział w konferencjach i zjazdach naukowych, krajowych i międzynarodowych (załącznik 3 część III, pkt. B1-24).

Podsumowując całość dorobku naukowego; jestem autorem/współautorem 28 prac naukowych (załącznik 7), w tym 22 pełnotekstowych prac oryginalnych (włączając prace zaliczone do osiągnięcia habilitacyjnego) i 1 podręcznika, a także autorem/współautorem 24 streszczeń zjazdowych.

W 8 pracach naukowych jestem jedynym autorem, zaś w 6 innych pracach, pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Zgodnie z analizą bibliometryczną sumaryczny wskaźnik Impact Factor moich wszystkich prac naukowych wynosi **36,58** pkt., a odpowiadająca mu punktacja KBN/MNiSW wynosi **286** pkt. Liczba cytowań to 663 (658 bez autocytowań-wg Web of Science z dnia 10.07.2015 r.), a współczynnik Hirscha (wg Web of Science) jest równy **3**.

4.3. Udział w projektach badawczych

Brałam udział w 4 projektach badawczych, 1 międzynarodowym oraz 3 krajowych, finansowanych przez instytucje centralne wspierające naukę. Ponadto, byłam kierownikiem 8 projektów finansowanych przez Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w ramach dotacji MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego. Szczegółowe informacje na temat uczestnictwa w projektach badawczych znajdują się w załączniku 3 część II, pkt. I.

4.4. Udział w kursach i szkoleniach zawodowych

W całym okresie zatrudnienia doskonaliłam swoje umiejętności zawodowe, uczestnicząc w różnego typu kursach i szkoleniach, krajowych oraz zagranicznych.

- 2014- Praktyczne aspekty projektowania, monitorowania i analizy wyników randomizowanych eksperymentów klinicznych, Małopolski Ośrodek Medycyny Translacyjnej UJ Kraków, Polska
- 2012- Certyfikat stwierdzający znajomość Dobrej Praktyki Klinicznej (ICH GCP) potwierdzoną egzaminacyjnie – Stowarzyszenie na Rzecz Dobrej Praktyki Badań Klinicznych, Polska
- 2012- Ochrona prawna i ocena publikacji naukowych - konferencja szkoleniowa w ramach projektu „Harmonizacja zarządzania dydaktyką na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie”, Kraków, Polska
- 2012- Kompetencje i umiejętności informacyjne - kurs w ramach projektu „ Pro bono Collegi Medici Universitatis Jaiellonicae”, Kraków, Polska
- 2011- Kierownik laboratorium i audytor wewnątrz systemu zarządzania jakością w laboratoriach medycznych PN-EN ISO 15189:2008 - kurs, Instytut Kształcenia Menadżerów Jakości, Kraków, Polska
- 2006- 2nd Annual Applied Biosystems/MDS SCIX Maximizing Your LC/MS System Performance Users Workshop, Philadelphia, PA, USA
- 2005- Applications of Luminex xMAP Technology in Biological Research (Luminex ¹⁰⁰IS and Luminex Advanced Applications), Austin, TX, USA
- 2005- Theoretical and practical training Inno-BIA AlzBio3 (Luminex xMAP Technology), Innogenetics, Philadelphia, USA
- 2005-2009- okresowe szkolenia z zakresu techniki LC MS/MS organizowane przez firmę Applied Biosystem, dla użytkowników spektrometrów masowych, Philadelphia, PA, USA
- 2003- Techniki analizy i detekcji kwasów nukleinowych i białek, kurs praktyczny, Poznań, Polska
- 2000- Training Course on new PCR technologies and optimization strategies, Eppendorf, Poznań, Polska

Certyfikaty potwierdzające znajomość języków obcych

- 1998- Certificate of Proficiency in English, University of Cambridge, Local Examination Syndicate, International Examinations, Kraków, Polska
- 1996- First Certificate in English, University of Cambridge, Local Examination Syndicate, International Examinations, Kraków, Polska

5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNO-ORGANIZACYJNA

Od początku zatrudnienia na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego ważnym aspektem mojej pracy była działalność dydaktyczna, obejmująca prowadzenie zajęć dla studentów kierunków Analityka Medyczna i Farmacja.

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora realizowałam zajęcia dydaktyczne z zakresu *Biochemii Klinicznej* dla studentów kierunku Analityka Medyczna oraz *Toksykologii* dla studentów kierunków Analityka Medyczna oraz Farmacja.

Jedną z moich najważniejszych aktywności dydaktycznych był udział w opracowaniu programu ćwiczeń oraz organizacji zajęć dydaktycznych z nowo wprowadzonego przedmiotu *Biologia Molekularna* dla studentów Wydziału Farmaceutycznego kierunku Analityka Medyczna oraz Farmacja oraz udział w przygotowaniu programu ćwiczeń z przedmiotu *Biochemia Kliniczna* dla studentów kierunku Analityka Medyczna.

W latach 1997-2001 byłam zaangażowana w realizację 7 prac magisterskich wykonywanych w Zakładzie Analityki Biochemicznej, pod kierownictwem ówczesnego Kierownika Zakładu, Prof. dr hab.med. Jerzego Jaśkiewicza

Po uzyskaniu stopnia doktora współuczestniczyłam w tworzeniu sylabusów dla przedmiotów realizowanych przez Zakład Analityki Biochemicznej. Ponadto przygotowywałam i prowadziłam zajęcia dydaktyczne z przedmiotów *Biochemia Kliniczna*, *Biologia Molekularna* oraz *Systemy Jakości i Akredytacja Laboratoriów Medycznych*; w ramach studiów przeddyplomowych na kierunku Analityka Medyczna (studia magisterskie i zawodowe studia licencjackie) oraz przedmiotu *Biologia Molekularna* dla studentów kierunku Farmacja (studia dzienne i wieczorowe). Prowadziłam również zajęcia dydaktyczne z przedmiotów: *Biologia Molekularna*, *Biochemia* oraz *Biochemia Kliniczna*; w ramach Zawodowych Studiów Podyplomowych w zakresie Analityki Medycznej.

W latach 2009-2015 (corocznie) brałam udział w realizacji zajęć fakultatywnych dla studentów Oddziału Analityki Medycznej, w tym autorskich zajęć w ramach fakultetu *Specjalistyczny język angielski*.

Ponadto prowadziłam wykłady z przedmiotu *Metodologia Badań Naukowych* dla studentów studiów doktoranckich Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, oraz uczestniczyłam w szkoleniu farmaceutów w ramach *Specjalizacji z zakresu Farmacji Aptecznej*.

W latach 2002-2005 oraz 2010-2015 byłam promotorem 14 prac magisterskich wykonanych przez studentów kierunku Analityka Medyczna oraz Farmacja. Pełniłam także funkcję recenzenta 10 prac magisterskich i licencjackich, realizowanych przez studentów kierunku Analityka Medyczna.

W sumie, po uzyskaniu stopnia doktora (w okresie 10.2002-02.2005 i 03.2009-06.2015) zrealizowałam około 3500 godzin dydaktycznych, w tym blisko 450 godzin na studiach podyplomowych.

Pracując w Biomarker Research Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA brałam udział w szkoleniu personelu z zakresu techniki Luminex xMAP Technology.

Przez cały okres pracy angażowałam się w działalność organizacyjną na rzecz Wydziału Farmaceutycznego. Za najważniejszy aspekt tej działalności uważam udział w organizacji Zakładu Analityki Biochemicznej, a także wieloletnią współpracę z wieloma laboratoriami diagnostycznymi prowadzoną z ramienia Wydziału w trakcie pełnienia funkcji koordynatora zajęć praktycznych w ramach przedmiotu *Praktyczna Nauka Zawodu* oraz *Wakacyjnych Praktyk Zawodowych*; dla studentów kierunku Analityka Medyczna.

Szczegółowe informacje na temat mojej działalności dydaktycznej i organizacyjnej znajdują się w załączniku 3 (część III, pkt. I oraz część III, pkt.Q).

