



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk



Polskie Towarzystwo Farmakologiczne
oraz Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk zapraszają na konferencję

DNI FARMAKOLOGII POLSKIEJ
26-29 MAJA 2024



Hotel Jawor | Ustroń-Jaszowiec

www.jaszowiec.ptf.info.pl





Książka abstraktów

Pierwsze Dni Farmakologii Polskiej

Ustroń-Jaszowiec, 26-29 maja 2024 r.

Tytuł:

Książka abstraktów
Pierwsze Dni Farmakologii Polskiej

Redaktor: Prof. Tomasz Kocki, Dr hab.
Bernadeta Szewczyk, Dr Anna Rafało-Ulińska

ISBN: 978-83-908945-2-2

Komitet naukowy

Prof. dr hab. Tomasz Kocki – Przewodniczący

Prof. dr hab. Małgorzata Filip

Prof. dr hab. Piotr Popik

Prof. dr hab. Przemysław Mikołajczak

Prof. dr hab. Ewa Obuchowicz

Prof. dr hab. Halina Car

Prof. dr hab. Marek Kowalczyk

Prof. dr hab. Andrzej Małecki

Prof. dr hab. Henryk Trzeciak

dr hab. Bernadeta Szewczyk

Komitet organizacyjny

Prof. dr hab. Tomasz Kocki

Dr hab. Bernadeta Szewczyk

Dr hab. Zofia Danilczuk

Dr Dorota Bederska-Łojewska

Dr Anna Rafało-Ulińska

Dr Łukasz Gąsior

Dr Piotr Chmielarz

Dr Monika Rykaczewska -Czerwińska

Dr Katarzyna Wicha-Komsta

Dr Tomasz Słomka

Mgr Yana Babii

Mgr Agata Machaczka

Organizator nie bierze odpowiedzialności za treści zawarte w abstraktach. Abstrakty nie są recenzowane

Organizatorzy:

Polskie Towarzystwo Farmakologiczne



Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej
Akademii Nauk



Sponsorzy:



ANIMA LAB



**Oferta do badań przedklinicznych
na zwierzętach laboratoryjnych i komórkach**

- Modele zwierzęce z dostawą
- Stereotaksja
- Systemy do anestezji
- Narzędzia chirurgiczne
- Mikroiniekcje, systemy infuzji
- Obrazowanie *in-vivo*
- Systemy do badań behawioralnych, metabolicznych, fizjologicznych
- Elektrofizjologia
- Obrazowanie komórek wysokiej rozdzielczości
- Liczniki komórek

**Wyposażenie laboratoriów, serwis urządzeń
laboratoryjnych**

- Komory laminarne
- Autoklawy
- Zmywarki laboratoryjne
- Systemy oczyszczania wody
- Ciepłarki, komory klimatyczne
- Inkubatory CO₂



www.animalab.pl **ANIMA LAB** info@animalab.pl
+48 61 861 60 04

Spis treści

PLENARY LECTURE

Prof. Kostrzewa Richard Amourphous Selective Neurotoxins: Chemical Aids in Neuroscience	12
Prof. Riccardo Brambilla Mice, patients and cells: multiple approaches to understand neurodevelopment disorders associated to 16p11.2 copy number variations	14
Katarzyna Niemirowicz-Laskowska, Natalia Stefaniuk, Przemysław Wielgat, Paweł Misiak, Izabela Kurowska, Karolina Markiewicz, Agnieszka Wilczewska, Halina Car Potencjał nanocząstek polimerowych w terapii nowotworów piersi – badania in vitro	15
Bartłomiej Pochwat Rola receptora serotoninowego 5-HT7 - patofizjologia depresji i działania niepożądane leków przeciwdepresyjnych	16

ORAL LECTURE

Piotr Chmielarz, Katarzyna Maziarz, Gabriela Burda, Justyna Barut, Anna Alwani Czynniki neurotroficzne i związane z nimi ścieżki sygnałowe w terapii choroby Parkinsona	17
Jakub Jurczyk, Weronika Krzyżanowska, Lucyna Pomierny-Chamioło, Dauda Abdullahi, Bogusława Budziszewska, Bartosz Pomierny Wpływ AP39 – donora siarkowodoru – na parametry funkcjonalne mitochondriów w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu	18
Małgorzata Piechaczek, Żaneta Broniowska, Józef Mizera, Lucyna Pomierny-Chamioło Donor siarkowodoru AP39 redukuje ubytki motoryczne w ogniskowym udarze niedokrwinnym u myszy	19
Aleksandra Wisłowska-Stanek, Alicja Sobolewska, Danuta Turzyńska, Anna Skórzewska Różnice płciowe w podatności na zespół stresu pourazowego (PTSD): ocena interakcji estrogen- CRF	20
Piotr Gruca, Ewa Litwa, Magdalena Łasoń, Dominika Biała, Mariusz Papp Optogenetyczne badania mechanizmów braku działania leków przeciwdepresyjnych w zwierzęcym modelu depresji lekoopornej	21
Ewa Litwa, Piotr Gruca, Magdalena Łasoń, Dominika Biała, Mariusz Papp Efekty lezji brzuszego hipokampa w modelu chronicznego łagodnego stresu.	22
Katarzyna Pawlik-Szczerba, Katarzyna Ciapała, Wioletta Makuch, Agata Ciechanowska, Joanna Mika Modulacja CCR1 i CCR3 zmniejsza objawy bólu neuropatycznego poprzez różnorodny wpływ na mikroglej/makrofagi i neutrofile	23
Katarzyna Ciapała, Ewelina Rojewska, Katarzyna Pawlik, Agata Ciechanowska, Joanna Mika Wpływ modulacji wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych na nadwrażliwość bólową u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego	24
Agata Ciechanowska Wpływ farmakologicznej modulacji osi XCL1/XCR1 oraz XCL1/ITGA9 na objawy nadwrażliwości bólowej w mysim modelu neuropatii ,	26
Diana Sawicka, Agnieszka Hryniewicka, Anna Sadowska, Beata Skonieczna, Halina Car Sole imidazoliowe z kwasem litocholowym ograniczają wzrost nowotworu jelita grubego i raka sutka	27

Anna Sadowska, Diana Sawicka, Ewa Ząpora, Beata Skonieczna, Halina Car	Potencjał grzybów nadrzewnych w ograniczeniu rozwoju nowotworu jelita grubego	28
Miłosz Gołyszny, Michał Zieliński, Ewa Obuchowicz		
	Czy działanie neuropeptydu S u szczurów stresowanych w okresie dojrzewania jest wynikiem zmian w ekspresji oksytocyny i wazopresyny?	29
Michał Zieliński, Miłosz Gołyszny, Ewa Obuchowicz	Stres we wczesnym okresie życia wpływa na działanie lipopolisacharydu na ekspresję cytokin (IL-1β, IL-10) w mózgowiu szczurów w okresie dojrzewania - badania na samcach i samicach.	30
Katarzyna Curzytek, Kinga Kamińska, Anna Gąsior, Joanna Kozieł, Stanisław Malicki, Kubera Marta	Rola punktów kontrolnych układu odpornościowego w patomechanizmie depresji	31
Agata Chudzik, Katarzyna Wicha-Komsta, Tomasz Kocki, Radosław Rola, Grzegorz Stanisław	Wpływ stresu prenatalnego i suplementacji diety bakteriami probiotycznymi na behavior i metabolity szlaku kynureninowego u szczurów	32
Wicha-Komsta Katarzyna	Znaczenie analizy głównych składowych (PCA) w farmakologii	33
Zofia Wicik	Bioinformatyka integracyjna, nowe oblicze badań naukowych	34
Emilia Sokołowska, Diana Sawicka, Anna Sadowska, Irena Kasacka, Halina Car	Porównanie bezpieczeństwa i skuteczności regulacji glikemii trehalozy, izomaltulozy i D-tagatozy.	35
Patrycja Kaczara	Farmakologiczna modulacja metabolizmu energetycznego sposobem regulacji aktywności płytek krwi	36
Ceren Eyileten Postula, Marta Skorupska, Zofia Wicik, Anna Członkowska	Clinical implantation of non-coding RNAs as treatment and biomarkers; particular focus for rare genetic diseases	37
Anna Nowak-Szwed, Zofia Wicik, Ceren Eyileten, Sara Ahmadova, Jolanta Siller-Matula, Dirk von Lewinski, Harald Sourij, Marek Postuła	Kardioprotekcyjne działanie empagliflozyny poprzez szlak sirtuiny-ncRNA po zawale mięśnia sercowego	38
Ryszkiewicz Piotr, Marta Baranowska-Kuczko, Anna Pędzińska-Betiuk, Patryk Remiszewski, Barbara Malinowska	Echokardiograficzna ocena progresji i odpowiedzi na farmakoterapię indukowanego monokrotaliną nadciśnienia płucnego	39
Nikola Gapińska, Piotr Właż, Marcin Jakubiec, Michał Abram, Krzysztof Kamiński, Katarzyna Ciepiela, Elżbieta Wyska, Alan González Ibarra, Dawid Krokowski, Marek Tchórzewski, Katarzyna Socała	Ocena wpływu SSR 504734 na pobudliwość drgawkową i działanie wybranych leków przeciwdrgawkowych u myszy	40
Magdalena Białoń, Katarzyna Popiołek-Barczyk, Żaneta Michalec-Warzecha, Katarzyna Starowicz	Modulacja układu endokannabinoidowego a objawy charakterystyczne dla schizofrenii – efekt działania β-kariofilenu w zwierzęcym modelu choroby	41
Poster		
Zofia Rogóż, Kinga Kamińska, Elżbieta Lorenc – Koci	Ocena działania łącznego chronicznego podawania arypiprazolu z N-acetylocysteiną w neurorozwojowym modelu schizofrenii	42
Izabela Szpręgiel, Agnieszka Bysiek, Krystyna Gołębiewska	Wpływ psylocybiny na aktywność osi HPA szczurów	43

<i>Agnieszka Bysiek, Izabela Szpręgiel, Krystyna Gołombiowska</i> Wpływ psylocybiny na uwalnianie neuroprzekazników w korze czołowej szczurów poddanych chronicznemu łagodnemu stresowi	44
<i>Ewa Poleszak, Anna Serefko, Sylwia Wośko, Aleksandra Szopa, Weronika Słotwińska, Weronika Andrea Gieleta, Dorota Ołtarzewska, Jarosław Szponar, Agnieszka Czyłkowska, Bernadeta Szewczyk</i> Wpływ kwasu azjatykowego na działanie leków przeciwdepresyjnych	45
<i>Agnieszka Potasiewicz</i> Szczegółowa ocena rozwoju wokalizacji osesków w neurorozwojowym modelu schizofrenii	47
<i>Natalia Malikowska-Racia, Piotr Popik</i> Deficyty motywacji u szczurów w teście wyboru opartego na wysiłku - potencjalny model zaburzeń nawiązujących do apatii	48
<i>Yana Babii, Agnieszka Pałucha-Poniewiera, Grzegorz Burnat, Andrzej Pilc</i> Połączone podanie skopolaminy oraz NAM receptora mGlu2 jako potencjalna strategia leczenia depresji	49
<i>Jolanta Orzelska-Górka, Katarzyna Dos Santos Szewczyk, Ewa Kędzierska, Marta Kruk-Słomka, Grażyna Biała</i> Kwas protokatechowy zmniejsza deficyty behawioralne w mysim modelu zespołu stresu pourazowego	50
<i>Anna Rafała-Ulińska, Michał Santocki, Agnieszka Pałucha-Poniewiera</i> M-5MPEP, częściowy modulator receptora mGlu5 indukuje szybkie działanie przeciwdepresyjne w mechanizmie zależnym od BDNF	51
<i>Ewa Kędzierska, Ewa Gibuła-Tarłowska, Marta Kruk-Słomka</i> Synteza i aktywność farmakologiczna nowych pochodnych arylopiiperazyny	52
<i>Joanna Listos, Krzysztof Fronc, Adrian Pysiewicz, Małgorzata Łupina, Marta Kruk-Słomka</i> Wpływ długotrwałej ekspozycji długotrwałej ekspozycji dorastających myszy na napój energetyzujący i sporadyczne dawki etanolu na funkcjonowanie myszy dorosłych – znaczenie mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) w hipokampie	53
<i>Agata Korlatowicz, Katarzyna Latocha, Paulina Pabian, Ryszard Bugno, Adam Hogendorf, Tamás Kovács, Andrzej J. Bojarski, Zoltan Varga, Agata Faron-Górecka</i> Rola GABAB i GAD w regulacji neurochemicznej w zwierzęcym modelu depresji lekoopornej	54
<i>Patrycja Rachwał, Jakub Jurczyk, Zuzanna Guzda, Alicja Skórkowska, Bartosz Pomierny, Lucyna Pomierny-Chamiło</i> Ocena aktywności terapeutycznej donora siarkowodoru AP39 w modelu fototrombotycznego ogniskowego zawału mózgu u myszy	55
<i>Beata Grygier, Kinga Kamińska, Krzysztof Szczepanowicz, Piotr Warszyński, Władysław Lasoń, Agnieszka Basta-Kaim</i> Wpływ wolnego ederavonu i ederavonu zamkniętego w nanokapsułkach na hodowlę organotypowe hipokampa w modelu udaru niedokrwiennego mózgu	56
<i>Zofia Danilczuk, Beata Krasuska-Grzegorzczak, Halina Szymczyk</i> Ocena wpływu ACEA 1025 w zwierzęcym modelu neurotoksyczności wywołanej deksametazonem	57
<i>Joanna Solich, Agata Faron-Górecka, Paulina Pabian, Katarzyna Latocha, Marta Dziedzicka-Wasylewska</i> miR-1a-3p modulatorem podatności i odporności na stress	60
<i>Patrycja Jastrząb, Robert Czarnomysy, Halina Car, Przemysław Wielgat</i> Modyfikacja sjalilacji błony komórkowej glejaka jako mechanizm modulujący wrażliwość komórek na inhibitory EGFR	61
<i>Adam Hołownia, Katarzyna Milewska, Agata Niechoda</i> Fosforylacja p53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (A549); wpływ cisplatyny i pyłów zawieszonych 62	

Dorota Bederska-Łojewska, Justyna Turek, Agata Machaczka, Łukasz Gąsior, Bartłomiej Pochwał, Bartłomiej Rospond, Joanna Piotrowska, Bernadeta Szewczyk Wpływ niedoboru cynku i przewlekłego stresu unieruchomienia na homeostazę cynku i miedzi, ekspresję metalotionein oraz status stresu oksydacyjnego w wątrobie	63
Łukasz Gąsior, Richard Musson, Hafsa Gulzar, Grażyna Ewa Ptak Czy diapauza zarodkowa może odmłodzić zarodki? Wpływ diapauzy na ekspresję genów w blastocystach pochodzących od matek w zaawansowanym wieku	65
Gołębiowska Joanna, Judith Homberg, Natalia Alenina, Michael Bader, Popik Piotr, Agnieszka Nikiforuk Wpływ zmiany poziomu serotoniny w mózgu na pamięć wzrokową zwierząt w teście rozpoznawania nowego obiektu (NOR)	67
Katarzyna Głombik, Magdalena Kukla-Bartoszek, Małgorzata Borczyk, Jacek Hajto, Marcin Piechota, Michał Korostyński, Agnieszka Basta-Kaim Prenatalne podanie deksametazonu prowadzi do obniżenia ekspresji genów kodujących białka rybosomalne w korze czółowej	69
Andrzej J. Plech, Monika Rykaczewska - Czerwińska, Dominika Czewińska - Główna Cardiovascular effects in SARS - CoV – 2 infected humans.	70
Andrzej J. Plech, Monika Rykaczewska - Czerwińska, Dominika Czewińska - Główna Mental and neurological effects in SARS - CoV – 2 infected patients.	70
Halina Car, Diana Sawicka, Sebastian Maciak, Anna Sadowska, Marek Konarzewski Myszy ze zróżnicowanym tempem metabolizmu (BMR) jako doskonały model badania rozwoju chorób cywilizacyjnych	71
Ewelina Cyrano, Agnieszka Potasiewicz, Piotr Popik, Agnieszka Nikiforuk Rozwój badań behawioralnych: analiza interakcji społecznych szczurów oparta na uczeniu maszynowym	72
Bujak Karol Prezentacja firmy Polygen Sp. z o.o., Gliwice	73

PLENARY LECTURE

Amourphous Selective Neurotoxins: Chemical Aids in Neuroscience. Richard M. Kostrzewa. *Department of Biomedical Sciences, Quillen College of Medicine, East Tennessee State University, Johnson City Tennessee, 37604, USA.*

As stated by the noted Physiologist Walter B. Cannon, one can often deduce the broad functions of a nerve by observing the loss of function when the nerve is destroyed. Indeed, that is so. However, it is difficult when there is more than one nerve type in a nerve bundle; or when a nerve is deep in the brain; or when the nerve is only the length of a few millimeters. Toxins, non-specific, have been known for eons to have the ability to damage nerves, but such damage is broad in effect, resulting in injury to multiple neural phenotypes. The era of *selective neurotoxins* owes its origin to the discovery by Nobel Laureates R. Levi-Montalcini and S. Cohen, who showed in the 1950s that an antibody to the neurotrophin Nerve Growth Factor (NGF; anti-NGF) would prevent development of sympathetic nerves in rodents, resulting in the loss of sympathetic noradrenergic innervation. In the 1960s Hans Thoenen and J.P. Tranzer surreptitiously discovered that a norepinephrine isomer, namely 6-hydroxydopamine, effectively destroyed both noradrenergic and dopaminergic nerves. Since that time there has been a library of new-found selective neurotoxins, able to destroy nerves – owing to affinity for neural transporters (i.e., selective uptake), or affinity to specific receptors (e.g., excitotoxins), or to an action on a particular element / protein or enzyme in particular neuronal phenotypes. More-recently we discovered that the non-toxin dopamine D₂ receptor (D₂-R) agonist quinpirole, when administered regularly and at intervals during post-natal ontogeny, is able to produce life-long supersensitization of D₂-R. Being a permanent effect, this non-toxin quinpirole thus produces a life-long adversity (supersensitization); consequently, the outcome is a neurotoxic effect in the absence of nerve damage. Quinpirole-priming results in behavioral abnormalities in response to D₂-R agonist treatments. Moreover, D₂-R supersensitization alters the interplay of dopaminergic nerves with those nerves of a different phenotype. In consequence, rats displaying D₂-R supersensitivity have been found to be reasonable models for schizophrenia; and with interplay on tardive dyskinesia; while related studies have modeled Parkinson's Disease and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). The broad array of selective neurotoxins available for neuroscience research has vastly expanded the opportunities for animal modeling of human neurological or psychiatric states, to importantly provide insight into how other neuronal phenotypes are altered (intra-neural changes; receptor dynamics, etc.)

when one nerve of a single phenotype is altered. More windows will open for observation of neural interplay, as time moves forward with *selective neurotoxin* research studies.

Mice, patients and cells: multiple approaches to understand neurodevelopment disorders associated to 16p11.2 copy number variations

Prof. Riccardo Brambilla

Neuroscience and Mental Health Innovation Institute, School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, UK; Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

Potencjał nanocząstek polimerowych w terapii nowotworów piersi – badania in vitro

Katarzyna Niemirowicz-Laskowska¹, Natalia Stefaniuk¹, Przemysław Wielgat², Paweł Misiak³, Izabela Kurowska³, Karolina Markiewicz³, Agnieszka Wilczewska³, Halina Car¹

¹⁾ *Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

²⁾ *Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

³⁾ *Wydział Chemii, Uniwersytet w Białymstoku*

Nanotechnologia jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki i techniki, łączącą w sobie elementy biologii, chemii, mechaniki oraz informatyki. Produktami nanotechnologii są nanocząstki, które zgodnie z definicją Komisji europejskiej są strukturami o wielkości do 100 nm przynajmniej w jednym wymiarze. Nanostruktury charakteryzują się unikalnymi parametrami fizykochemicznymi oraz właściwościami biologicznymi dzięki czemu ich zastosowanie w terapii (leczenie celowane), jak również w diagnostyce (detekcja, obrazowanie), zwłaszcza chorób nowotworowych otwiera wiele nowych możliwości.

Jednymi z najbardziej obiecujących kandydatów rozpatrywanych jako potencjalne nośniki leków są nanocząstki polimerowe. Ze względu na wysoką kompatybilność z komórkami gospodarza, zdolności regeneracyjne i immunomodulujące nanocząstek polimerowych, jak również możliwość poprawy parametrów farmakokinetycznych stosowanych obecnie chemioterapeutyków, istnieje możliwość zastosowania tego typu nanoformulacji jako komponentów bądź też jako nowych form leków w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. W związku z powyższym, projektowane są tzw. inteligentne nośniki polimerowe [34]. Ich nazwa związana jest z faktem, iż w odpowiedzi na zmianę warunków środowiska są one zdolne do uwolnienia enkapsulowanej substancji aktywnej w sposób bodźco-zależny. Częsteczka leku może być uwięziona w nośniku polimerowym w wyniku utworzenia wiązań kowalencyjnych lub poprzez oddziaływania niekowalencyjne.

W niniejszym wystąpieniu przedstawione zostaną wyniki badań odzwierciedlające właściwości biologiczne oraz potencjał nośników na bazie polimerów termowrażliwych tj. i N-izopropyloterylamidu oraz N-winylokaprolaktamu jako nośników doksorubicyny w terapii raka piersi w modelu in vitro. Podjęcie powyższej tematyki, umotywowane zostało faktem, iż ostatnie lata pokazują, iż wśród nowo zdiagnozowanych zachorowań w latach 2020 – 2023 na choroby nowotworowe u kobiet najczęściej występował rak piersi (25 %), wyprzedzając raka płuc (12 %), jelita grubego (11 %) i macicy (10 %). Nowotwór ten stał się najczęstszą przyczyną zgonów wśród kobiet zarówno w Polsce jak i na świecie. Doksorubicyna (DOX) to związek organiczny z grupy antybiotyków antracyklinowych, będący najpowszechniej stosowanym lekiem w leczeniu raka piersi. Chemioterapia oparta na DOX, choć skuteczna, wiąże się z ciężkimi działaniami niepożądanymi, w tym nieodwracalną kardiotoxycnością i supresją szpiku kostnego. W efekcie wspomniane wyżej zagrażające życiu skutki uboczne terapii, które wydłużają okres rekonwalescencji pacjentów jak i znacząco zwiększają koszty leczenia, skłaniają do stworzenia nowej, bezpieczniejszej opcji terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej inteligentne systemy dostarczania leków.

Podziękowania: NCN/2019/35/B/ST5/03391 (AZW)

Rola receptora serotoninowego 5-HT₇ - patofizjologia depresji i działania niepożądane leków przeciwdepresyjnych

Dr Bartłomiej Pochwat

*Zakład Neurobiologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk,
Kraków*

Mechanizm działania większości leków stosowanych w leczeniu depresji polega na modulacji układu serotonergicznego w mózgu. Z molekularnego punktu widzenia leki te najczęściej blokują transporter dla serotoniny (SERT), zwiększając tym samym jej stężenie w zakończeniach synaptycznych. Następnie serotonina wiąże się z serotoninowymi receptorami wywołując charakterystyczne dla każdego receptora molekularne efekty. Blokada SERT powoduje, że biologiczny efekt serotoniny jest niespecyficzny. Tzn. pobudzeniu ulegają wszystkie dostępne receptory. Warto dodać, że wyodrębniono aż 7 (od 5-HT₁ do 5-HT₇) różnych typów receptorów serotoninowych, wewnątrz których istnieje także zróżnicowanie. Jednocześnie należy pamiętać, że oprócz terapeutycznej skuteczności stosowanie leków blokujących SERT wiąże się z opóźnionym początkiem działania, niepożądanymi działaniami oraz rezydualnymi objawami depresji. Niekiedy zdarza się, że u pacjentów stosujących te leki chronicznie, pojawiają się objawy, które nie występowały przed podjęciem farmakoterapii. Mogą to być np. problemy ze snem, dysfunkcje seksualne czy różnego typu zaburzenia kognitywne. Rodzi to pytanie o to, czy stymulacja niektórych receptorów serotoninowych może prowadzić do wyżej opisanych zaburzeń. Bazując na dostępnej literaturze przedmiotu i badaniach własnych można sformułować hipotezę badawczą o potencjalnej roli serotoninowego receptora 5-HT₇ w generowaniu działań niepożądanych leków oraz objawów rezydualnych depresji. Powyższa hipoteza staje się jeszcze bardziej atrakcyjna w obliczu danych, które wskazują, że wortioksetyna, lek który zarówno blokuje SERT jak i receptor 5-HT₇ jest jednym z najlepiej tolerowanych przez pacjentów lekiem przeciwdepresyjnym. Także przedkliniczne, badania własne, w których używano selektywnego agonisty serotoninowego receptora 5-HT₇ uprawdopodobniają tę hipotezę.

Czynniki neurotroficzne i związane z nimi ścieżki sygnałowe w terapii choroby Parkinsona

Piotr Chmielarz, Katarzyna Maziarz, Gabriela Burda, Justyna Barut, Anna Alwani

Zakład Biochemii Mózgu, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Choroba Parkinsona to postępujące, związane z wiekiem zaburzenie neurodegeneracyjne o niejasnej etiologii. W obrazie histopatologicznym, choroba ta charakteryzuje się obecnością złogów białkowych znanych jako ciała Lewyego oraz degeneracją neuronów dopaminergicznych. Uważa się, że patogeneza choroby Parkinsona wiąże się z kombinacją wielu czynników ryzyka, takich jak wiek, predyspozycja genetyczna czy ekspozycja na czynniki środowiskowe. Najnowsze wyniki badań wskazują, że oprócz tych czynników ryzyka, prionopodobne rozprzestrzenianie się patologicznej formy białka alfa-synukleiny - będącego jednym z głównych składników ciał Lewyego - odgrywa istotną, a być może niezbędną, rolę w patogenezie choroby Parkinsona. Wciąż jednak, pomimo wielu hipotez dotyczących podłoża choroby Parkinsona bezpośrednia przyczyna śmierci neuronów dopaminowych w tej chorobie pozostaje niejasna, a wszystkie dotychczasowe próby zatrzymania lub spowolnienia ich degeneracji zawiodły. Obecnie dostępne są jedynie terapie symptomatyczne.

Pod koniec XX wieku wielkie nadzieje na skuteczną terapię choroby Parkinsona wiązano z zastosowaniem czynników neurotroficznych. Są to białka wspierające przetrwanie, rozwój i funkcjonowanie neuronów. Dzięki ich wszechstronnemu działaniu wspierającemu przeżycie neuronów, w tym neuronów dopaminowych, istniała nadzieja, że zatrzymają lub przynajmniej spowolnią procesy degeneracyjne obserwowane u pacjentów z chorobą Parkinsona. Jednakże, pomimo początkowo obiecujących wyników wczesnych faz badań klinicznych, czynniki neurotroficzne zawiodły w dużych próbach klinicznych. Zasugerowano wówczas że czynniki neurotroficzne są nieskuteczne w obecności agregatów alfa-synukleiny. Jednak ostatnie badania wskazują, że to raczej kwestie techniczne, związane z trudnościami w dostarczaniu czynników neurotroficznych do mózgu, oraz sama konstrukcja przeprowadzonych badań klinicznych, mogły być kluczowymi przyczynami niepowodzeń. Obecnie znów wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem czynników neurotroficznych – lub molekuł aktywujących powiązane z nimi ścieżki sygnałowe – w terapii choroby Parkinsona. Również nasze badania wskazują, że czynników neurotroficznych nie należy jeszcze skreślać – niedawno wykazaliśmy w modelach *in vitro* i *in vivo*, że czynnik neurotroficzny GDNF przez aktywację kinazy tyrozynowej RET i z pośrednictwem szlaku Akt, chroni neurony dopaminowe przed akumulacją patologicznej formy alfa-synukleiny. Zaobserwowaliśmy również podobne efekty ochronne przy nadekspresji konstytutywnie aktywnego Akt oraz przy użyciu aktywującego ścieżkę Akt agonistę receptora greliny, związek MK0677.

Podsumowując, najnowsze wyniki badań zachęcają do dalszego badania czynników neurotroficznych jako potencjalnego narzędzia w walce z chorobą Parkinsona.

Wpływ AP39 – donora siarkowodoru – na parametry funkcjonalne mitochondriów w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu

Jakub Jurczyk¹, Weronika Krzyżanowska¹, Lucyna Pomierny-Chamioło¹, Dauda Abdullahi², Bogusława Budziszewska¹, Bartosz Pomierny¹

¹⁾ *Katedra Toksykologii, Zakład Biochemii Toksykologicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków*

²⁾ *Department of Neuroimaging, King's College London.*

Wstęp: Udar niedokrwienno mózgu stanowi jedną z głównych przyczyn zgonów i niepełnosprawności na świecie, powodując znaczne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. Pomimo dziesięcioleci badań farmakoterapia interwencyjna tego schorzenia jest bardzo ograniczona. Istnieje zatem ogromna potrzeba społeczna poszukiwania nowych metod terapii wymierzonych w tę chorobę. Istnieją dowody sugerujące korzystne działanie donorów siarkowodoru (H₂S) w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu, jednak wciąż pozostają niejednoznaczne.

Cel: Badanie to podjęto w celu oceny neuroprotekcynego działania AP39 – cząsteczki uwalniającej H₂S w przestrzeni mitochondrialnej neuronów – pod kątem zmian funkcjonalnych tych organelli po przejściowym niedokrwieniu mózgu.

Metodyka: Wykorzystano model 90-minutowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (MCAO) u szczura, wraz z techniką monitorowania przepływu krwi systemem analizy kontrastu plamki lasera (LASCA). AP39 (100 nmol/kg, i.v.) podano 10 minut po przywróceniu krążenia. Przyżyciowo oceniono deficyty neurologiczne (skala Philipasa) i senso-motoryczne (grid-walking test) oraz objętość zawału za pomocą rezonansu magnetycznego. Post mortem potwierdzono obszar niedokrwienia barwieniem TTC. Wykorzystując analizator Seahorse XF określono parametry funkcjonalne (efektywność fosforylacji oksydacyjnej i glikolizy) wyizolowanych mitochondriów z ipsilateralnych obszarów kory czołowej i prążkowie grzbietowego. W tych samych regionach mózgu określano liczbę i morfologię mitochondriów komórek nerwowych przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Wyniki: AP39 spowodował zmniejszenie objętości zawału, deficytów neurologicznych i senso-motorycznych. Wykazano modulujący wpływ badanego związku na tempo zużycia tlenu i poziom glikolizy, a także potencjał ochronny w zakresie dynamiki i morfologii mitochondriów po udarze. Wyniki wskazują, że AP39 może mieć korzystne działanie w chorobach niedokrwienno, jednak konieczne są dalsze starania nad szczegółowym określeniem molekularnego mechanizmu jego działania.

Donor siarkowodoru AP39 redukuje ubytki motoryczne w ogniskowym udarze niedokrwinnym u myszy

Małgorzata Piechaczek¹, Żaneta Broniowska¹, Józef Mizera², Lucyna Pomierny-Chamioło²

¹⁾ *Zakład Biochemii Toksykologicznej, Katedra Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków*

²⁾ *Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum*

Zablokowanie fizjologicznego przepływu krwi przez naczynie mózgowe powoduje wystąpienie zespołu objawów neurologicznych, a zwłaszcza deficytów motorycznych. Szybkie udrożnienie naczynia daje szansę na powrót do sprawności fizycznej, jednakże niepowodzenie reperfuzji wiąże się z poszerzaniem strefy uszkodzenia co pociąga za sobą niepełnosprawność, a często również zgon pacjenta. Nadzieję niosą strategie działania neuroprotektynowe celujące w przywrócenie funkcji natywnych jak największej liczby uszkodzonych przez niedokrwienie neuronów obszaru penumbry. Obiecującym związkiem o działaniu neuroprotektynowym jest ukierunkowany na mitochondria donor siarkowodoru, związek AP-39. Mitochondria to organelle krytycznie narażone na niedotlenienie, a ich uszkodzenie pociąga za sobą nieodwracalną utratę funkcji neuronu.

Celem zaprezentowanego eksperymentu była ocena efektywności jednokrotnego podania AP39 w leczeniu zaburzeń motorycznych spowodowanych ogniskowym udarem niedokrwinnym mózgu u myszy bez reperfuzji.

W badaniu wykorzystano 6 miesięczne samce i samice myszy szczepu C57BL/6J. U zwierząt ustalono kończynę przednią dominującą, a po stwierdzeniu stabilności w zadaniu zręcznego sięgania wywołano ogniskowe niedokrwienie kory mózgowej odpowiedzialnej za motorykę kończyny dominującej oraz podano związek AP39 lub vehiculum (100 nmol/kg m.c., s.c). Wystąpienie udaru potwierdzono śródzabiegowo obrazowaniem przepływu naczyniowego w korze mózgowej. Trening kontynuowano przez kolejnych 7 dni, a oceny ubytków motorycznych dokonano za pomocą skali oceny neurologicznej Bedersona oraz w teście zręcznego sięgania. Pośmiertnie oceniono również wielkość strefy martwicy

Wyniki badania wskazują na korzystny wpływ podania AP39 na motorykę zarówno u samców jak i u samic. Zwierzęta z grupy badanej osiągały lepsze rezultaty w zadaniu zręcznego sięgania. Trening był metodą oceny sprawności motorycznej, ale można go uznać również za formę rehabilitacji ruchowej. Zaobserwowano ponadto zmniejszenie śmiertelności okołoudarowej w grupie zwierząt otrzymujących donora siarkowodoru w porównaniu do grupy kontrolnej. Celowe wydają się być dalsze badania na poziomie molekularnym.

Różnice płciowe w podatności na zespół stresu pourazowego (PTSD): ocena interakcji estrogen- CRF

Aleksandra Wisłowska-Stanek¹, Alicja Sobolewska², Danuta Turzyńska², Anna Skórzewska²

¹⁾ Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²⁾ Zakład Neuronauki Doświadczalnej i Klinicznej, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Celem badania było określenie roli układu czynnika uwalniającego kortykotropinę (CRF) w podatności na wystąpienie zespołu stresu pourazowego (PTSD) u samic szczurów. Ryzyko wystąpienia PTSD jest dwukrotnie wyższe u kobiet niż u mężczyzn. Badania epidemiologiczne sugerują, że u kobiet ryzyko wystąpienia zaburzeń lękowych lub nasilenia istniejących objawów wzrasta w okresach wahań poziomu estrogenów to jest w okresie dojrzewania, połogu i menopauzy. Badania przedkliniczne wykazały, że samice o wysokim poziomie estrogenów (faza proestrus) charakteryzują się słabszą reakcją lękową w porównaniu z samicami o niższym poziomie estrogenów (faza diestrus). Uważa się, że związane z cyklem menstruacyjnym wahania podatności na stres mogą przyczyniać się do większego ryzyka wystąpienia PTSD u kobiet. Różnice płciowe modyfikują również skuteczność terapii, na przykład, u kobiet w fazie wysokiego poziomu estradiolu, wygaszanie lęku jest skuteczniejsze niż w okresie niskiego poziomu estradiolu. Neurobiologiczne podłoże płciowej predyspozycji do PTSD może być związane z różnicami w funkcjonowaniu układów regulujących reakcje na stres w wyniku interakcji między hormonami płciowymi a peptydami stresu, takimi jak CRF. Potwierdzają to wyniki naszych badań, w których oceniano zaburzenia pamięci kontekstu awersyjnie uwarunkowanego (wygaszanie lęku) w predyspozycji do wystąpienia objawów PTSD w zależności od płci. Analiza behawioralna wykazała, że samice w fazie proestrus w warunkach stresu, charakteryzowały się zmniejszoną reakcją lękową podczas ekspozycji na kontekst awersyjny w porównaniu do samic w fazie diestrus i samców. U zwierząt tych stwierdzono również wzrost ekspresji CRF i ER α w korze infralimbicznej (IL) oraz spadek ekspresji receptorów ER β w korze przedlimbicznej (PL) w porównaniu do samic w fazie diestrus i samców. Ponadto, w jądrach centralnych ciała migdałowatego (CeA), ekspozycja na kontekst awersyjny zmniejszyła aktywność białka CRF oraz zwiększyła poziomu kortykosteronu u samic w fazie proestrus w porównaniu do samic w fazie diestrus i samców. U samic z niskim poziomem estrogenów podczas wydarzenia traumatycznego, ponowna ekspozycja na kontekst awersyjny, zwiększyła ekspresję receptorów CRF2 w jądrach podstawnych ciała migdałowatego (LA) i receptorów CRF2 i ER β w CeA w porównaniu do samic z wysokim poziomem estrogenów i samców.

Wydaje się, że ekspozycja na kontekst awersyjny samic z wysokim poziomem estrogenów, zwiększa aktywności IL, która poprzez projekcję glutaminergiczną do GABAergicznych neuronów wstawkowych (ITC), zmniejsza aktywność CeA i osłabia reakcję lękową. Natomiast, u samic z niskim poziomem estrogenów nasilenie reakcji lękowej podczas ekspozycji na kontekst awersyjny prawdopodobnie wywołane jest pro-lękowym działaniem receptorów ER β w CeA. Nasze badania sugerują, że interakcję pomiędzy hormonami płciowymi a układem CRF regulują warunkowaną reakcję lękową i podatność na wystąpienie PTSD.

Optogenetyczne badania mechanizmów braku działania leków przeciwdepresyjnych w zwierzęcym modelu depresji lekoopornej

Piotr Gruca, Ewa Litwa, Magdalena Łasoń, Dominika Biała, Mariusz Papp

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Około 30% pacjentów cierpiących na depresję nie reaguje na leczenie lekami przeciwdepresyjnymi. Powoduje to, że depresja oporna na leczenie (TRD) stanowi obecnie jeden z ważniejszych problemów współczesnej psychiatrii. W ostatnich latach pojawiły się nowe skuteczniejsze strategie leczenia depresji lekoopornej (Treatment-Resistant Depression, TRD), obejmujące elektryczną głęboką stymulację mózgu (Deep Brain Stimulation, DBS) oraz zastosowanie nowatorskich leków (zwłaszcza ketaminy i jej pochodnych), których punktem uchwytu wydaje się kora przedczołowa. Ryzyka towarzyszące tym postępowaniom motywują do dalszych poszukiwań skutecznych lecz bezpieczniejszych dla pacjentów terapii TRD. Przeszkodą utrudniającą badania podstawowe w tym zakresie był brak dobrze zweryfikowanego zwierzęcego modelu TRD.

W naszych wcześniejszych badaniach opracowaliśmy taki model, przy zastosowaniu procedury Przewlekłego Łagodnego Stresu (Chronic Mild Stress, CMS) u szczurów szczepu Wistar-Kyoto (WKY). Wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do szczurów Wistar, u szczurów WKY leki przeciwdepresyjne nie znoszą anhedonii, lęku i zaburzeń poznawczych wywołanych CMS. Deficyty te są natomiast odwracane przez podanie szczurom WKY ketaminy lub zastosowanie DBS przyśrodkowej kory przedczołowej (mPFC).

Mechanizmy braku wrażliwości na terapię przeciwdepresyjną nie są poznane. Postawiliśmy hipotezę, że przyczyną oporności na działanie leków przeciwdepresyjnych może być osłabienie funkcjonowania określonych szlaków aferentnych i eferentnych mPFC. Stwierdziliśmy, że CMS powodował zmniejszenie spożycia sacharozy oraz zaburzenia zachowania szczurów WKY w testach podniesionego labiryntu krzyżowego i rozpoznawania nowego obiektu. Deficyty te uległy stopniowemu odwróceniu przez wenlafaksynę, lecz tylko gdy przewlekłym podaniom leku przeciwdepresyjnego towarzyszyło wielokrotne optogenetyczne pobudzanie określonych projekcji mPFC – aferentnej z brzuszego hipokampa (vHIP) oraz eferentnej do jądra półleżącego przegrody (NAc). Sama stymulacja optogenetyczna tych szlaków, bez podań leku przeciwdepresyjnego, była w tym modelu nieskuteczna. Podobnie, optogenetyczna stymulacja połączeń dHIPP-mPFC oraz vHIPP-NAc nie torowała efektu wenlafaksyny.

Synergia między wenlafaksyną i optogenetyczną stymulacją szlaków vHIP-mPFC i mPFC-NAc świadczy, że zjawisko lekooporności powiązane jest z niewydolnością obwodu vHIP-mPFC-NAc. Translacyjne znaczenie tej niewydolności i jej geneza w chorobie depresyjnej pozostają nadal niewyjaśnione i są przedmiotem naszych dalszych badań.

Efekty lezji brzuszego hipokampa w modelu chronicznego łagodnego stresu.

Ewa Litwa, Piotr Gruca, Magdalena Łasoń, Dominika Biała, Mariusz Papp

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Pomimo wielu lat badań nad mechanizmami depresji, trudno określić jej przyczyny, a stosowane leki przeciwdepresyjne często okazują się nieskuteczne, co dla pacjenta powoduje konieczność doboru innej farmakoterapii. W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy, że osłabienie transmisji pomiędzy brzuszną częścią hipokampa a korą przedczołową w zwierzęcym modelu depresji może przyczyniać się do wystąpienia objawów depresyjnych. Optogenetyczna oraz elektryczna stymulacja ścieżki neuronalnej pomiędzy tymi dwoma strukturami odwróciła anhedonię, zaburzenia pamięci oraz interakcji socjalnych, a także obniżyła poziom lęku w modelu chronicznego łagodnego stresu. Zmiany obserwowane były w modelu depresji, u szczurów rasy Wistar, oraz w modelu depresji lekoopornej, u szczurów rasy Wistar-Kyoto. Badania te pokazujące, że brak odpowiedzi na leki przeciwdepresyjne można pokonać poprzez dodatkową stymulację połączeń hipokamp-kora przedczołowa pozwoliły wysunąć hipotezę, że osłabienie połączeń neuronalnych w obrębie tego szlaku może wpływać na słabsze działanie leków przeciwdepresyjnych, a nawet odpowiadać za lekooporność.

Aby sprawdzić tę hipotezę, wykonaliśmy lezję brzuszego hipokampa za pomocą kwasu ibotenowego, co eksperymentalnie odzwierciedla osłabienie połączeń biegnących z brzuszego hipokampa do kory przedczołowej. Lezja kwasem ibotenowym brzusznej części hipokampa, wywołała zmiany w zachowaniu zwierząt widoczne poprzez zwiększenie anhedonii i poziomu lęku oraz zaburzenie funkcji poznawczych i interakcji socjalnych. W badaniach elektrofizjologicznych lezja powodowała obniżenie amplitudy wejściowo-wyjściowej i obniżyła LTP u zwierząt stresowanych. DBS, (głęboka stymulacja mózgu, ang. Deep Brain Stimulation) odwrócił efekty lezji potwierdzając jej wykorzystanie do badania lekooporności w kontekście braku działania leków przeciwdepresyjnych. Natomiast leczenie venlafaksyną nie było w stanie całkowicie odwrócić negatywnych efektów lezji w modelu chronicznego łagodnego stresu. Wyniki dotychczasowych doświadczeń potwierdzają naszą hipotezę, że w stanie depresji aktywność szlaku brzuszny hipokamp-kora przedczołowa jest osłabiona, a oporność na leki przeciwdepresyjne może wynikać z braku możliwości przywrócenia pełnej aktywności powyższej ścieżki przez leki przeciwdepresyjne.

Badania były finansowane z projektu wewnętrznego Intramural Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Modulacja CCR1 i CCR3 zmniejsza objawy bólu neuropatycznego poprzez różnorodny wpływ na mikroglej/makrofagi i neutrofile

Katarzyna Pawlik-Szczerba, Katarzyna Ciapała, Wioletta Makuch, Agata Ciechanowska, Joanna Mika

Zakład Farmakologii Bólu, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk im. Jerzego Maja, Kraków, Polska

Pomimo licznych badań terapia bólu neuropatycznego jest w wielu przypadkach nieskuteczna, a mechanizm nadal nie do końca poznany. Najnowsze dane wskazują, że modulacja niektórych receptorów chemokinowych, takich jak CCR2 i CCR5 może mieć korzystny efekt w leczeniu bolesnej neuropatii. Celem naszych eksperymentów było zbadanie wpływu antagonistów receptorów chemokinowych CCR1 i CCR3 na procesy nocyciepcji u szczurów i myszy, a także określenie ich wpływu na markery mikrogleju/makrofagów i neutrofile oraz porównanie działania przeciwbólowego substancji w zależności od płci. Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów Wistar oraz samcach/samicach myszy Albino Swiss. Model bólu neuropatycznego wykonano poprzez uszkodzenie nerwu kulszowego, które polega na jego podwiązaniu (4-krotnie u szczurów i 3-krotnie u myszy). Szczurom podawano wielokrotne, przez kolejne 7 dni po uszkodzeniu, podpajęczynówkowo antagonistów CCR1 [J113863 (J11); 0.1 µg/5µl] oraz CCR3 [SB328437 (SB); 10 µg/5µl]. Następnie przeprowadzono testy behawioralne w celu pomiaru nadwrażliwości mechanicznej i termicznej, a po ich zakończeniu pobierano fragmenty L4-L6 rdzenia kręgowego oraz odpowiadające im zwoje korzeni grzbietowych (DRG) do analizy. Dodatkowo u myszy porównywano skuteczność blokady CCR1 i CCR3 między płciami podając jednorazowo, podpajęczynówkowo w dawce 20 µg/5µl zarówno selektywnych antagonistów (J11 i SB), jak i podwójnego antagonistę CCR1/3 (UCB35625, UCB) w dniu 12 po uszkodzeniu. Nasze wyniki wskazują, że 7 dni po podwiązaniu nerwu pojawia się nadwrażliwość mechaniczna i termiczna, natomiast wielokrotne podania zarówno J11 jak i SB osłabiają jej rozwój. Przeprowadzone badania wykazały podwyższony poziom białka IBA-1 (marker mikrogleju/makrofagów) i MPO (marker neutrofile) w rdzeniu kręgowym i DRG w 7 dniu. Co ważne na poziomie rdzenia kręgowego, J11 przyczynia się do mniejszych zmian w poziomie IBA-1, podczas gdy SB osłabia wzrost MPO. Ponadto zastosowani antagoniści zmniejszają wzrost poziomu MPO w DRG. Co ciekawe, u myszy zaobserwowano różnice w skuteczności J11 pomiędzy płciami, przy czym lepszą skuteczność związku stwierdzono u samców. Natomiast SB i UCB w podobny sposób uśmierzają ból u obu płci. Podsumowując, nasze wyniki dowodzą, że blokowanie CCR1 przez J11 i CCR3 przez SB, jak również podwójna blokada receptorów przez UCB zmniejsza nadwrażliwość mechaniczną i termiczną po podwiązaniu nerwu kulszowego u zwierząt obu płci. Zaobserwowane działanie może wynikać z wpływu tych antagonistów na silnie napływające oraz zaktywowane komórki. Co ciekawe, J11 obniża przede wszystkim poziom markera mikrogleju/makrofagów, podczas gdy SB neutrofile. Dane te dostarczają pierwszych dowodów na to, że CCR1 i CCR3 mogą odgrywać rolę w rozwoju bólu neuropatycznego, a otrzymane wyniki być może kiedyś przyczynią się do powstania skutecznych terapii neuropatii. Podziękowania: Badania sfinansowano z grantu NCN OPUS22 2021/43/B/NZ7/00230 oraz środków statutowych IF PAN.

Wpływ modulacji wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych na nadwrażliwość bólową u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego

Katarzyna Ciapała, Ewelina Rojewska, Katarzyna Pawlik, Agata Ciechanowska, Joanna Mika

Zakład Farmakologii Bólu, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja, Polska Akademia Nauk

Ból neuropatyczny rozwija się na skutek uszkodzenia lub choroby somatosensorycznego układu nerwowego, a jego przewlekły charakter utrudnia codzienne funkcjonowanie, znacząco obniżając jakość życia osób zmagających się z tym zaburzeniem. Najnowsze badania wskazują, że jedną z najważniejszych kaskad modulujących transmisję nocyceptywną jest rodzina kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAP) i kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), a także czynnik jądrowy erytroidalny 2 związany z czynnikiem 2 (Nrf2). Dlatego też celem eksperymentów było określenie potencjału przeciwbólowego nieselektywnych modulatorów kinaz MAP – fisetyny, peiminy, astaksantyny i artemizyny, a także bardoksolonu metylu (selektywny aktywator Nrf2) oraz 740 Y-P (selektywny aktywator PI3K) u myszy w modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego (model Bennetta) oraz zbadanie wpływu tych substancji na działanie przeciwbólne opioidów. Nadwrażliwość dotykową i termiczną zwierząt mierzono odpowiednio za pomocą testów von Freya i zimnej płytki. Badane związki podawano podpajęczynówkowo, w różnych dawkach, w 7 dniu po uszkodzeniu nerwu, a następnie wybraną dawkę każdego związku podawano z morfiną, buprenorfiną lub oksykodonom. Fisetyna, peimina i astaksantyna skutecznie obniżała nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy po uszkodzeniu, natomiast artemizyna nie wykazywała takich efektów. Co więcej, oba testowane aktywatory, bardoksolon metylu i 740 Y-P, również wykazały działanie przeciwbólne po podaniu podpajęczynówkowym u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego. W przypadku astaksantyny i bardoksolonu metylowego zaobserwowano lepszy efekt przeciwbólowy po łącznym podaniu z morfiną, buprenorfiną i/lub oksykodonom w obu testach. Fisetyna i peimina w podobny sposób nasilały analgetyczne działanie morfiny i oksykodonu zmniejszając nadwrażliwość na bodźce dotykowe. W przypadku podań 740 Y-P z lekami opioidowymi zaobserwowano jedynie spadek nadwrażliwości termicznej. Wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują, że substancje modulujące wszystkie trzy MAPK przynoszą ulgę w bólu i poprawiają skuteczność opioidów, szczególnie jeśli dodatkowo blokują NF- κ B jak peimina, hamują NF- κ B i aktywują PI3K, tak jak fisetyna, czy aktywują Nrf2, tak jak astaksantyna. W świetle tych eksperymentów aktywacja Nrf2 wydaje się być szczególnie korzystna. Testowane substancje przynoszą obiecujące wyniki w badaniach podstawowych, a dalsze badania nad nimi poszerzą wiedzę na temat mechanizmów neuropatii i być może przyczynią się do opracowania w przyszłości skuteczniejszego leczenia. Podziękowania: Badania sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, grantu OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 oraz środków statutowych Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN.

Wpływ farmakologicznej modulacji osi XCL1/XCR1 oraz XCL1/ITGA9 na objawy nadwrażliwości bólowej w mysim modelu neuropatii

Agata Ciechanowska,

Zakład Farmakologii Bólu Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Pomimo postępu nauki i medycyny ból neuropatyczny wciąż stanowi ogromny problem dla klinicystów. Jest to choroba, która znacznie obniża jakość życia dotkniętych nią osób. Leki opioidowe, które są ważnym remedium na dolegliwości bólowe, okazują się nieskuteczne u około 50% osób dotkniętych neuropatią. Poszukuje się więc skutecznych terapii skojarzonych o mniejszym ryzyku działań niepożądanych. Dane wskazują, że po uszkodzeniach układu nerwowego następuje wzrost poziomu markerów licznych komórek immunologicznych i glejowych, co skorelowane jest również ze wzrostem poziomu markerów zapalnych takich jak interleukiny czy chemokiny. W naszych badaniach prowadzonych na myszach szczepu Albino swiss skupiliśmy się na jednej z czterech rodzin chemokinowych, a mianowicie na rodzinie XC-. Zbadaliśmy ekspresję XCL1, a także dwóch jej receptorów u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego w pięciu punktach czasowych. Pokazaliśmy, że wraz ze wzrostem nadwrażliwości na bodźce mechaniczne i termiczne następuje wzrost poziomu XCL1 w rdzeniu kręgowym aż do 35 dnia po uszkodzeniu. Ponadto, co niezwykle ciekawe wykazaliśmy, że XCL1 kolokalizuje z komórkami astrogleju, które ulegają aktywacji w neuropatii. Natomiast obydwa receptory XCR1 oraz ITGA9 występują na neuronach w rdzeniu kręgowym, co może tłumaczyć szybkie i silne pronocyceptywne działanie XCL1 po podpajęczynówkowym podaniu. W modelu neuropatii w dniu 7, zaobserwowaliśmy ulgę w bólu zarówno po podaniu podpajęczynówkowym przeciwciała neutralizującego XCL1, jak również po zablokowaniu jej receptorów - XCR1 oraz ITGA9. Ponadto po zastosowaniu łącznych podań tych trzech narzędzi farmakologicznych z morfiną zaobserwowaliśmy, że przeciwciała neutralizujące XCL1 i ITGA9 nasilają jej efekty analgetyczne. Dowiedliśmy również, że wielokrotne podania minocykliny, która jest tetracykliną stosowaną u ludzi, obniża poziom pronocyceptywnej XCL1. Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że sygnalizacja XCL1/XCR1 i XCL1/ITGA9 przyczynia się do rozwoju nadwrażliwości bólowej. Spośród przebadanych receptorów, to atypowy ITGA9 wydaje się być lepszym punktem uchwytu dla terapii, jednak obydwa są godne uwagi w poszukiwaniu skutecznej strategii leczenia bólu neuropatycznego. Co ważne, zarówno blokada XCL1, jak i ITGA9 wydaje się ciekawym podejściem ze względu na jej korzystny wpływ na efektywność leków opioidowych. Podziękowania: Badania sfinansowano z grantu NCN OPUS22 2021/43/B/NZ7/00230 oraz środków statutowych IF PAN.

Podziękowania: NCN/2019/35/B/ST5/03391 (AZW)

Sole imidazoliowe z kwasem lithocholowym ograniczają wzrost nowotworu jelita grubego i raka sutka

Diana Sawicka¹, Agnieszka Hryniewicka², Anna Sadowska¹, Beata Skonieczna¹, Halina Car¹

¹⁾ *Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

²⁾ *Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

Głównym celem chemii medycznej jest udoskonalenie właściwości biologicznych związków wyjściowych poprzez połączenie ze sobą cząsteczek bioaktywnych w celu zwiększenia ich skuteczności działania. Możliwości i zaangażowanie nowoczesnych technik chemicznych pozwala na uzyskanie produktu końcowego o zwiększonej aktywności poprzez łączenie kilku związków w jedną substancję o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Zsyntetyzowano 10 soli imidazoliowych z kwasem lithocholowym (LCA) różniących się liczbą atomów węgla w łańcuchu alifatycznym (C1-C16) celem wspomagania efektywności standardowej chemioterapii stosowanej w hamowaniu wzrostu nowotworów jelita grubego oraz sutka.

Sole imidazoliowe są związkami, które w swojej budowie chemicznej posiadają pięcioczłonowy pierścień imidazoliowy o charakterze aromatycznym, natomiast kwas lithocholowy jest organicznym kwasem syntetyzowanym w wątrobie, który stanowi końcowy produkt rozkładu endogenego, wewnątrzustrojowego cholesterolu. Kwas ten hamuje α -2,3-sialilotransferazy, moduluje receptor witaminy D i wykazuje aktywność przeciwnowotworową.

W badaniach *in vitro* z zastosowaniem soli imidazoliowych z LCA wykazaliśmy istotne zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych jelita grubego linii: DLD-1, HT-29 i Caco-2 oraz komórek nowotworowych sutka linii: MCF-7 i MDA-MB-123, przy jednocześnie niższej toksyczności w stosunku do zdrowych fibroblastów skóry linii CRL1475, zależne od długości łańcucha LCA. W badaniach przeprowadzonych na modelach choroby w warunkach *in vivo*: nowotworu jelita grubego oraz raka sutka zaobserwowano istotnie wolniejszy wzrost wyindukowanych guzów w trakcie podawania przez 28 dni soli LCA_Hex oraz LCA_Okt (zawierających odpowiednio C6 i C8 w łańcuchu alkilowym) w dawce 500 mg/kg m.c. Ponadto, uzyskany efekt zastosowanych soli w zahamowaniu wzrostu guza nowotworu jelita grubego i raka sutka był silniejszy w porównaniu do zastosowanych leków referencyjnych: 5-fluorouracylu i doksorubicyny, odpowiednio. Badania morfologii krwi oraz pomiary masy ciała badanych zwierząt nie wykazały toksycznego działania podawanych soli.

Innowacyjność uzyskanych soli imidazoliowych na bazie kwasu lithocholowego charakteryzuje prosty sposób ich produkcji, wysoka wydajność poszczególnych etapów syntezy, łatwość oczyszczania produktów oraz istotna aktywność biologiczna przy zastosowaniu niedużych stężeń. Sole imidazoliowe z LCA posiadają wysoką biokompatybilność, znaczną aktywność przeciwnowotworową przy jednocześnie niskiej toksyczności dla organizmu.

Potencjał grzybów nadrzewnych w ograniczeniu rozwoju nowotworu jelita grubego.

Anna Sadowska¹, Diana Sawicka¹, Ewa Zapora², Beata Skonieczna², Halina Car²

¹⁾ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²⁾ Katedra Hodowli i Użytkowania Lasu, Politechnika Białostocka

³⁾ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Leki przeciwnowotworowe dostępne na rynku wywierają liczne działania niepożądane oraz powikłania, podkreśla to potrzebę wprowadzenia nowych skutecznych i mniej toksycznych preparatów. W ostatnich latach obserwowany jest ogromny wzrost zainteresowania grzybami jako rezerwuarami naturalnych związków aktywnych wynikający z szerokiego spektrum ich działania biologicznego. Grzyby uznawane były przez stulecia nie tylko za element diety człowieka, ale także wykorzystywano je od tysięcy lat w tradycyjnej medycynie chińskiej. Wśród grzybów wielkoowocnikowych istnieje liczna grupa o udowodnionych właściwościach farmakologicznych, tj. wykazujących działanie: antynowotworowe, immunomodulacyjne, przeciwzapalne, antyutleniające, antywirusowe, antybakteryjne, antygrzybicze, przeciwpasożytnicze, przeciwmiażdżycowe, detoksykacyjne, hepatoprotekcyjne oraz hipoglikemiczne. Przedmiotem szczególnych zainteresowań badawczych zespołu jest korzeniowiec sosnowy (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) (HA) - grzyb, który powoduje hubę korzeni - jedną z najważniejszych pod względem gospodarczym chorób lasu w Polsce i w strefie klimatu umiarkowanego. Grzyb ten poraża drzewa w ciągu całego cyklu rozwojowego drzewostanu.

Celem naszych badań była ocena działania ekstraktu z HA w zakresie ograniczenia przeżywalności komórek nowotworowych jelita grubego jak i zahamowania wzrostu guza *in vivo*. Zaobserwowano zmniejszone przeżycie komórek nowotworowych jelita grubego linii DLD-1 oraz zahamowanie biosyntezy DNA. Istotnym rezultatem było słabe działanie ograniczające żywotność fibroblastów, co wskazało na małą toksyczność wobec zdrowych komórek. Badania wstępne pozwoliły na zastosowanie ekstraktu u myszy z wyindukowanym nowotworem jelita grubego, w których uzyskano zmniejszenie masy guza. Badania prowadzono w kilku równoległych grupach, z wykorzystaniem różnych stężeń ekstraktu oraz z 5-fluorouracylem, jako lekiem referencyjnym, gdyż istotnym było poznanie interakcji z lekami stosowanymi w terapii raka jelita grubego celem określenia potencjalnego wspomaganie obecnych terapii. Łączne zastosowanie ekstraktu i 5-FU spowodowało większe ograniczanie wzrostu guzów jelita grubego niż po samym HA. Kolejnym etapem było poszukiwanie mechanizmów działania ekstraktu z korzeniowca sosnowego. Wyniki testu ELISA wykazały zwiększone stężenie białka p53 i kaspazy 8 w grupach zwierząt, którym podawano ekstrakt, również w połączeniu z 5-FU, w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy stężenie surwiwiny było najwyższe w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki wskazują na proapoptotyczne działanie ekstraktu. Dotychczas opisywana efektywność korzeniowca sosnowego stanowi podstawę do dalszych badań nad aktywnością przeciwnowotworową ekstraktu z HA.

Czy działanie neuropeptydu S u szczurów stresowanych w okresie dojrzewania jest wynikiem zmian w ekspresji oksytocyny i wazopresyny?

Miłosz Gołyszny, Michał Zieliński, Ewa Obuchowicz

Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

Wyniki badań ostatnich lat wskazują na potencjalne znaczenie neuropeptydów w terapii zaburzeń lękowych. Działanie przeciwlękowe neuropeptydu S (NPS) po podaniu ośrodkowym (Leonard i wsp., 2008) i donosowym (Lukas i Neumann, 2012) obserwowano w testach behawioralnych u myszy lub szczurów nie poddanych działaniu stresu. Dotychczas nie oceniano efektów podawania donosowego NPS u szczurów poddanych działaniu stresu.

W okresie od 45 do 47 dnia życia szczury (samce) szczepu Wistar zostały poddane działaniu ostrego stresu wg metodyki opisanej przez Cymerblit-Sabba i wsp. (2015). Głównym celem eksperymentu była ocena wpływu donosowego podania NPS (48 dnia życia) na zachowanie szczurów w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) oraz ekspresję genu arginino-wazopresyny (AVP) i oksytocyny (OXT) w podwzgórzu. Oznaczono również stężenia wymienionych nonapeptydów w osoczu krwi. Wiadomo, że AVP i OXT regulują odpowiedź organizmu na stres poprzez złożone mechanizmy ośrodkowe. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a ($\alpha=0.05$).

W teście EPM po 120 minutach od podania NPS (57 nmol in.) u szczurów stresowanych zaobserwowaliśmy osłabienie efektu lękowego indukowanego ostrym stresem. Zmianom behawioralnym towarzyszył znamieny statystycznie spadek ekspresji genu dla OXT oraz istotnie niższa niż w grupie szczurów niestresowanych ekspresja mRNA dla AVP w podwzgórzu.

Nasze wstępne badania wskazują na działanie przeciwlękowe NPS, ale u podłoża tego zjawiska nie leży wzrost ekspresji i aktywności nonapeptydów podwzgórzowych.

Stres we wczesnym okresie życia wpływa na działanie lipopolisacharydu na ekspresję cytokin (IL-1 β , IL-10) w mózgowiu szczurów w okresie dojrzewania - badania na samcach i samicach.

Michał Zieliński, Miłosz Gołyszny, Ewa Obuchowicz

Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

Procedura separacji potomstwa od matki (MS) jest powszechnie znanym modelem stresu we wczesnym okresie życia (Czéh i wsp., 2016), który może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zaburzeń lękowych w okresie dorastania lub dorosłości (Syed i Nemeroff 2017; Morris i wsp. 2019). Aktywacja układu immunologicznego, która manifestuje się zmianami ekspresji cytokin prozapalnych (np. IL-1 β) i przeciwzapalnych (np. IL-10) wpływa na funkcjonowanie

i rozwój układu nerwowego. Wpływ MS na ekspresję cytokin (Brydges i Reddaway, 2020) był tematem badań, ale jedynie nieliczne prace (Solarz i wsp., 2023) opisują to zjawisko u szczurów w okresie dojrzewania.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu MS, czynnika immunostymulującego - lipopolisacharydu (LPS) lub obu tych czynników na ekspresję genów interleukin: IL-1 β i IL-10 w strukturach mózgowia szczurów: opuszce węchowej, korze czołowej, hipokampie, ciele migdałowatym, przysadce mózgowej i podwzgórzu. Szczury szczepu Wistar (samce i samice) zostały podzielone na następujące grupy: kontrolną (C); szczury poddane działaniu MS (MS); szczury, którym wstrzyknięto LPS (LPS); szczury poddane działaniu MS, którym wstrzyknięto LPS (MS+LPS). W procedurze MS potomstwo było separowane od matki przez 360 minut w okresie od 2 do 15 dnia życia. W 42 dniu życia, szczurom wstrzykiwano jednorazowo ip. LPS (1 mg/kg; Escherichia coli serotyp 0111: B4) (LPS i MS+LPS) lub 0,9% roztwór NaCl (C i MS). Po dekapitacji, po 6 godzinach od wstrzyknięcia izolowano wyżej wymienione struktury mózgowia. Przeprowadzono dwustopniową reakcję RT PCR oraz obliczono relatywną ekspresję genów. Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu testu ANOVA lub testu Kruskal-Wallis'a i testów post hoc Tukey'a lub Dunn'a.

LPS spowodował wzrost ekspresji IL-1 β w ciele migdałowatym zarówno u samców, jak i u samic. Taką zmianę stwierdzono również u samców w podwzgórzu i hipokampie. Po podaniu LPS był znaczący spadek ekspresji IL-10 w podwzgórzu, hipokampie i opuszce węchowej u samców. Ponadto, MS miał różny, zależny od płci, wpływ na działanie LPS na ekspresję badanych interleukin, a mianowicie MS zwiększał efekt LPS wyłącznie u samic. U samic poddanych procedurze MS, LPS spowodował wzrost ekspresji IL-1 β w podwzgórzu, a spadek ekspresji IL-10 w podwzgórzu, hipokampie i korze czołowej. Stwierdzono także różnice w ekspresji badanych cytokin u samców i samic z grup kontrolnych. Wyższą ekspresję IL-1 β stwierdzono w podwzgórzu, przysadce, hipokampie i korze czołowej u samców, natomiast u samic była wyższa ekspresja IL-10 w podwzgórzu, hipokampie i korze czołowej.

Przedstawione wyniki sugerują, że u samic narażonych na działanie stresu we wczesnym okresie życia, aktywacja układu immunologicznego w okresie dojrzewania powoduje silniejszy efekt prozapalny w mózgowiu, co może zwiększać ryzyko rozwoju lub progresji chorób OUN w których patogenezie zapalenie odgrywa istotną rolę.

Rola punktów kontrolnych układu odpornościowego w patomechanizmie depresji

Katarzyna Curzytek¹, Kinga Kamińska¹, Anna Gąsiorek², Joanna Kozieł², Stanisław Malicki^{2,3}, Kubera Marta¹

¹⁾ *Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii im. J. Maja Polskiej Akademii Nauk*

²⁾ *Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński*

³⁾ *Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński*

Choroba afektywna jedno- i dwubiegunowa (potocznie zwana depresją) jest jedną z najczęstszych chorób psychicznych, a częstość jej występowania wzrasta na całym świecie. Wysiłki mające na celu opracowanie nowych leków przeciwdepresyjnych są wyzwaniem, po części dlatego, że nasza wiedza na temat patofizjologii depresji i mechanizmów przeciwdepresyjnych jest wciąż niekompletna. Istnieje zatem pilna potrzeba zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw patofizjologii depresji, które mogłoby otworzyć możliwości opracowania nowych strategii leczenia.

Badania miały na celu ocenę roli punktów kontrolnych układu odpornościowego (ang. Immune Checkpoints; ICP), a mianowicie receptora programowanej śmierci 1 (ang. programmed death receptor 1; PD-1) i jego liganda (programmed death-ligand 1; PD-L1), w mechanizmie rozwoju i przebiegu zaburzeń depresyjnych. Doświadczenia przeprowadzono na szczurach rasy Wistar Kyoto (WKY), szczurach rasy Wistar, poddanych 21-dniowemu stresowi unieruchomienia (ang. Chronic Restraint Stress, CRS) oraz na nietraktowanych samcach szczurów rasy Wistar jako zwierzętach kontrolnych. Ponadto, w badaniach wykorzystaliśmy myszy szczepu C57BL/6J narażone na powtarzające się zakażenie bakteriami *Porphyromonas gingivalis* (Pg), jako model depresji wywołanej chronicznym zapaleniem przyzębia. U wszystkich zwierząt przeprowadziliśmy weryfikację behawioralną, potwierdzającą depresyjny fenotyp badanych zwierząt.

Nasze badania wykazały zwiększoną ekspresję genu PD-L1 w korze czołowej myszy zakażonej bakteriami Pg oraz u szczurów poddanych procedurze CRS, a zmniejszoną ekspresję PD-L1 u szczurów WKY. W hipokampie natomiast, obserwowaliśmy spadek ekspresji PD-L1 u szczurów poddanych procedurze CRS i szczurów WKY. Wzrost ekspresji PD-1 obserwowano tylko u myszy infekowanych Pg w korze czołowej, w pozostałych strukturach i modelach nie obserwowaliśmy zmian. Co ciekawe, we wszystkich badanych zwierzęcych modelach depresji obserwowaliśmy taki sam obraz ekspresji PD-1/PD-L1 w komórkach PBMC, mianowicie wzrost ekspresji genu dla PD-1 i brak zmian w poziomie ekspresji PD-L1. Powyższe wyniki mogą sugerować, że w przebiegu zaburzeń depresyjnych dochodzi do zwiększenia aktywności zapalnej limfocytów obwodowych, przy jednoczesnym braku hamowania procesów zapalnych w strukturach mózgu, co najbardziej uwidacznia się w modelu depresji lekoopornej, reprezentowanym przez szczep szczurów Wistar Kyoto. Dlatego potrzebne są dalsze badania, zmierzające do oceny funkcji ICP w układzie nerwowym i odpornościowym, co pomoże nam wyjaśnić związek pomiędzy depresją i towarzyszącym jej stanem zapalnym.

Badania były finansowane z grantu OPUS-22 nr 2021/43/B/NZ6/02203, Narodowe Centrum Nauki.

Wpływ stresu prenatalnego i suplementacji diety bakteriami probiotycznymi na behavior i metabolity szlaku kynureninowego u szczurów

Agata Chudzik¹, Katarzyna Wicha-Komsta², Tomasz Kocki², Radosław Rola¹, Grzegorz Stanisław^{1,2,3}

¹ Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³Physical Sciences Platform, Sunnybrook Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

⁴Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Stres podczas ciąży może wpływać na rozwój i zachowanie potomstwa. Długoterminowe skutki behawioralne stresu prenatalnego u potomstwa obejmują deficyty uwagi, problemy z rozwojem psychomotorycznym i regulacją emocji, stany lękowe i depresyjne. Wykazano również, że metabolity szlaku kynureninowego odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych. Literatura podaje, że spożywanie specyficznych szczepów bakterii, może prowadzić do zmian neurochemicznych w mózgu, a w konsekwencji wpływać na zdrowie.

Głównym celem eksperymentu była ocena wpływu suplementacji diety ciężarnych samic bakteriami *Lactocaseibacillus rhamnosus* JB-1 (JB-1) na zachowanie oraz poziomy tryptofanu (TRP), kynureniny (KYN) oraz kwasu kynureninowego (KYNA) u potomstwa narażonego na stres prenatalny.

Badania przeprowadzono na samcach i samicach szczurów rasy Wistar poddanych stresowi prenatalnemu. U ciężarnych samic zastosowano model chronicznego stresu (ang. chronic unpredictable mild stress model, CUMS) oraz jednocześnie suplementowano je bakteriami JB-1 lub placebo w postaci zbuforowanej soli fizjologicznej. Potomstwo od dnia 46 po urodzeniu zostało poddane testom behawioralnym w celu oceny lęku oraz aktywności motorycznej. W dniu 48 od urodzenia pobrane zostały kory mózgowe, a następnie stężenie KYNA, KYN i TRP zostało oznaczone metodą HPLC z detekcją fluorymetryczną i UV. Ocenę statystyczną przeprowadzono za pomocą wieloczynnikowej oraz jednoczynnikowej ANOVA w programie R Studio (R wersja 4.3.1).

Wykazano, że stres prenatalny wpływa na zachowania lękowe samców i samic w teście uniesionego labiryntu krzyżowego, nie wykazano jednak tych zmian w teście otwartego pola u samic. Suplementacja diety ciężarnych matek bakteriami JB-1 wpływa na zachowania związane z aktywnością motoryczną potomstwa (zarówno u samic jak i u samców). Ponadto wykazano, że stres prenatalny jak i suplementacja bakteriami probiotycznymi w ciąży wpływa na stężenie TRP u potomstwa obu płci, jak również na stężenie KYNA u samic. U potomstwa płci męskiej stężenie KYNA zmieniło się wyłącznie pod wpływem stresu prenatalnego.

Stres prenatalny może wpływać na zachowanie i stężenie metabolitów szlaku kynureninowego. Natomiast suplementacja diety ciężarnych samic szczurów bakteriami JB-1 wpływa na wymienione parametry u potomstwa w mniejszym stopniu.

Badania zostały finansowane z grantu Preludium NCN (UMO-2021/41/N/NZ4/01767) oraz grantu wewnętrznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie DS 457.

Znaczenie analizy głównych składowych (PCA) w farmakologii

Wicha-Komsta Katarzyna

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie

W farmakologii, tak jak w innych naukach medycznych dysponujemy często bardzo dużą ilością zmiennych, które niosą ze sobą wiele informacji. Stosując do analizy danych klasyczne metody statystyczne można nie dostrzec istotnych prawidłowości, zależności, które ujawnia się dopiero po redukcji zmiennych opisujących dane zjawisko. Jedną z metod, która można do tego celu zastosować jest analiza głównych składowych (principal component analysis, PCA). Podstawowym zadaniem PCA jest zredukowanie początkowego zestawu zmiennych do nowego, jak najmniejszego zestawu nieskorelowanych zmiennych nazywanych już składowymi, które zawierają większość informacji znajdujących się w zmiennych oryginalnych. Składowe są kombinacją liniową badanych zmiennych, nie są ze sobą skorelowane, a każda kolejna składowa powinna wyjaśniać jak najwięcej zmienności niewyjaśnionej przez poprzednią.

PCA jest jedną z analiz chemometrycznych, które stale się rozwijają i znajdują zastosowanie m. innymi w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym ale też w medycznych naukach podstawowych. Świadczą o tym liczne publikacje naukowe w których ta metoda jest wykorzystywana. Ułatwia interpretację wyników, badanie związków przyczynowo-skutkowych czy projektowanie nowych leków, na każdym z etapów. Jest metodą szeroko dostępną, wszystkie programy komputerowe do analizy statystycznej umożliwiają jej wykonanie.

W przeprowadzonych badaniach naukowych, PCA zostało wykorzystane do interpretacji wyników badań nad wpływem różnych stężeń resweratrolu na poziomy metabolitów szlaku kynreninowego (KP)-kwasu kynureninowego, tryptofanu i kynureniny w różnych strukturach mózgu, osoczu i wątrobie szczurów. Ponadto została wykonana analiza ekspresji genów kodujących białka enzymatyczne szlaku KP- *KMO*, *KATI* i *KAT II*. Dzięki pogłębionej analizie chemometrycznej zaobserwowano istotne zależności pomiędzy poziomami metabolitów KP, dawkami resweratrolu. oraz ekspresją genów związanych z KP.

Bioinformatyka integracyjna, nowe oblicze badań naukowych

Zofia Wicik

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Bioinformatyka to interdyscyplinarna dziedzina łącząca biologię, informatykę i statystykę, zajmująca się zarządzaniem, analizą i interpretacją informacji biologicznych. Integracyjne podejście w bioinformatyce jest kluczowe, pozwalając na analizę i interpretację danych biologicznych z różnych perspektyw opartych na wielu źródłach. Wykorzystanie języków programowania, takich jak R i Python, umożliwia automatyczną analizę danych biologicznych o dużych rozmiarach, redukując błędy związane z ręczną obsługą programów z interfejsem graficznym. Podejście integracyjne do danych biologicznych jest istotne z kilku powodów: (I) Systemy biologiczne są złożone, a dane biologiczne generowane z różnych źródeł dostarczają informacji z różnych poziomów regulacji biologicznej. Bioinformatyka integracyjna umożliwia łączenie tych różnorodnych danych dla pełniejszego zrozumienia procesów biologicznych. (II) Integracja heterogenicznych danych pozwala na analizę informacji pochodzących z różnych technik eksperymentalnych i baz danych, co zapewnia bardziej kompleksowy obraz systemów biologicznych i umożliwia identyfikację związków i wzorców, niewidocznych przy analizie poszczególnych danych w izolacji. (III) Integrując dane z wielu źródeł, naukowcy mogą uzyskać wgląd w złożone interakcje i relacje w systemach biologicznych, co jest kluczowe do zrozumienia skomplikowanych mechanizmów biologicznych. (IV) Bioinformatyka integracyjna pozwala generować nowe hipotezy oparte na analizie różnych zestawów danych, co napędza odkrycia naukowe i poprawia nasze zrozumienie zjawisk biologicznych. (V) Bioinformatyka integracyjna odgrywa istotną rolę w przekładaniu wyników badań na praktyczne zastosowania, takie jak identyfikacja biomarkerów, rozwój narzędzi diagnostycznych i poprawa spersonalizowanych podejść medycznych. To podejście wypełnia lukę między badaniami podstawowymi a praktyką kliniczną, przynosząc korzyści w zakresie opieki nad pacjentem i jej wyników. W niniejszej prezentacji zaprezentowane najnowsze zastosowania narzędzi bioinformatycznych w integracji danych wielkoskalowych do identyfikacji biomarkerów związanych z chorobami serca.

Porównanie bezpieczeństwa i skuteczności regulacji glikemii trehalozy, izomaltulozy i D-tagatozy.

Emilia Sokołowska¹, Diana Sawicka², Anna Sadowska², Irena Kasacka³, Halina Car¹

¹⁾ Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²⁾ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³⁾ Zakład Histologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Otyłość powoduje upośledzenie działania insuliny w tkankach docelowych, takich jak wątroba, mięśnie i tkanka tłuszczowa. Dieta wysokotłuszczowa (HFD) jest związana z indukcją insulinooporności i prowadzi do rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 (T2DM). Celem badania było wyjaśnienie wpływu wzbogacenia wysokotłuszczowej diety w węglowodany o niskim indeksie glikemicznym, tj. izomaltulozę (IZO), lub trehalozę (TREH) bądź D-tagatozę (TAG) na kontrolę glikemii i masę ciała. Badanie trwało 90 dni, zostało przeprowadzone na samcach myszy C57BL6/cmdb podzielonych na dziewięć grup: Grupa 1 (Kontrola) - zwierzęta karmione standardową dietą, 2. (IR) - zwierzęta karmione dietą wysokotłuszczową (HFD), 3. (IR+IZO) - karmione HFD z dodatkiem izomaltulozy (5% w diecie), 4. (IR+TREH), 5. (IR+TAG), 6. (T2DM) - myszy z wywołaną streptozotocyną (STZ) T2DM karmione standardową dietą, 7. (T2DM+IZO), 8. (T2DM+TREH), 9. (T2DM+TAG). Masa ciała (BW) i poziom glukozy we krwi na czczo (FBG) u myszy były mierzone co tydzień. Skuteczna indukcja T2DM została potwierdzona przez FBG, doustny test tolerancji glukozy (OGTT) i dootrzewnowy test wrażliwości na insulinę (IPTT) w 26 i 31 dniu eksperymentu. W grupach IR i T2DM wystąpił wzrost stężenia glukozy, insuliny i wartości HOMA-IR. Wyniki OGTT wykazały, że po doustnym podaniu roztworu glukozy, poziom glukozy we krwi myszy z IR utrzymywał się powyżej 210,0 mg/dl przez okres do 60 minut, podczas gdy myszy z T2DM utrzymywał się powyżej 500 mg/dl przez okres do 60 minut. Natomiast myszy suplementowane IZO, TREH i TAG miały znacznie niższe poziomy glukozy we krwi niż myszy z IR i T2DM, przy czym myszy suplementowane TAG miały tolerancję glukozy podobną do kontroli. Pole pod krzywą (AUC) było znacznie niższe w grupie suplementowanej TAG w porównaniu z grupą IR (IR+TAG vs. IR, $p < 0,01$) oraz u myszy suplementowanych TREH lub TAG w porównaniu z grupą T2DM (T2DM+TREH vs. T2DM, $p < 0,05$; T2DM+TAG vs. T2DM, $p < 0,01$). Suplementacja TAG przywróciła wartość HOMA-IR oraz poziomy glukozy i insuliny do wartości kontrolnych. Wskaźniki HOMA-IR w grupach IR+IZO, IR+TREH i IR+TAG zmniejszyły się odpowiednio o 45,97%, 38,89% i 70,37% ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą IR. Wskazuje to, że TAG może zmniejszać insulinooporność u myszy z IR, co było zgodne z wynikami eksperymentu IPTT. Co więcej, TAG skutecznie kontrolowała masę ciała zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową. Ocena histologiczna wykazała wzrost średnicy i liczby wysepek trzustkowych w grupie otrzymującej TAG, co może wskazywać na regenerację wysepek trzustkowych. Ponadto, TAG wykazywała bardziej wyraźny wpływ na histologię trzustki w porównaniu z grupą otrzymującą IZO i TREH. Izomaltuloza, trehaloza i D-tagatoza to przykłady alternatywnych węglowodanów o niskim indeksie glikemicznym, które wprowadzone do diety jako suplementacja mogą wspomóc standardowe leczenie farmakologiczne w uzyskaniu poprawy profilu metabolicznego pacjentów z insulinoopornością i T2DM.

Farmakologiczna modulacja metabolizmu energetycznego sposobem regulacji aktywności płytek krwi

Patrycja Kaczara,

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)

Płytki krwi odgrywają ważną rolę w rozwoju zakrzepicy naczyń krwionośnych, która stanowi poważny problem kliniczny związany z chorobami układu krążenia. W celu przeciwdziałania lub leczenia zakrzepicy szeroko stosowane są leki przeciwplatekcyjne. Jednakże u niektórych pacjentów z chorobami metabolicznymi występuje hiperaktywność płytek krwi, pomimo stosowania tych leków, co sugeruje związek podniesionej aktywności płytek ze zmienionym metabolizmem energetycznym. Obecnie stosowane strategie przeciwplatekcyjne nie uwzględniają tego efektu. Wydaje się, że połączenie regulatorów metabolizmu z lekami przeciwplatekowymi mogą doprowadzić do rozwoju nowych strategii, które ograniczą hiperaktywność płytek krwi, bez zakłócania ich podstawowych funkcji. Poprzednio pokazaliśmy w izolowanych płytkach krwi, że cząsteczka uwalniająca tlenek węgla, CORM-A1, hamuje agregację płytek krwi poprzez hamowanie zarówno oddychania mitochondrialnego, jak i glikolizy na poziomie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) (Kaczara et al. *ATVB*, 2020;40:2376-2390). Podobne efekty, ale poprzez inne mechanizmy molekularne, można uzyskać za pomocą 3PO (3-(3-pirydynylo)-1-(4-pirydynylo)-2-propen-1-onu); inhibitor fosfofruktokinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy 3 (PFKFB3)), który w płytkach krwi hamuje nie tylko glikolizę, ale także oddychanie mitochondrialne.

Hipoteza leżąca u podstaw naszych badań zakłada, że farmakologiczna regulacja metabolizmu energetycznego wzmacnia działanie mediatorów i leków przeciwplatekowych, które same nie wpływają na metabolizm energetyczny. W badaniach zastosowaliśmy agregometrię opartą na transmisji światła widzialnego, technikę Seahors XFe 96 oraz chromatografię cieczową-tandemową spektrometrię mas (LC-MS/MS). Nasze wyniki wskazują, że działanie przeciwplatekowe znanych mediatorów, takich jak tlenek azotu (NO; dostarczany przez PAPA NONOate; działający poprzez mechanizm zależny od cGMP) i karbaprostacyklina (cPGI₂; działający poprzez mechanizm zależny od cAMP), jak również kangreloru (lek przeciwplatekowy działający poprzez blokowanie receptora P2Y₁₂ płytek krwi), w stężeniach hamujących agregację płytek krwi, nie wpływało na metabolizm energetyczny płytek.

Kombinacje CORM-A1 z kangrelorem lub 3PO z PAPA NONOate i cPGI₂ w stężeniach, w których każdy z nich indywidualnie tylko nieznacznie wpływał na agregację płytek krwi, pozwoliły na znaczne obniżenie aktywności agregacyjnej płytek. Zatem farmakologiczna regulacja metabolizmu energetycznego płytek krwi może nasilać przeciwplatekowe działanie leków. Wyniki naszych badań mogą mieć istotne znaczenie w przypadku łączenia leków przeciwplatekowych i terapii normalizujących metabolizm, stosowanych np. u pacjentów z cukrzycą lub otyłością. Strategie takie wymagają szczególnego wyczucia tak, aby obniżając hiperaktywność płytek krwi, jednocześnie nie zwiększać ryzyka niekontrolowanych krwawień.

Podziękowania:

Narodowe Centrum Nauki [OPUS 2021/41/B/NZ7/01426]

Clinical implantation of non-coding RNAs as treatment and biomarkers; particular focus for rare genetic diseases

Ceren Eyileten Postula¹, Marta Skorupska¹, Zofia Wicik¹, Anna Czlonkowska²

¹⁾ *Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny*

²⁾ *II Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie*

Introduction: Wilson's Disease (WD) is an autosomal-recessive disorder of copper metabolism caused by ATP7B mutations. However, the fundamental question of why only some patients primarily manifest with liver and/or neurological disease remains. We anticipate that platelets and their regulators, such as non-coding RNAs impact the hepatic and neurological manifestation of WD. Therefore we aimed to analyze the platelets function and platelet-related ncRNAs expression changes in WD. Methods: Platelet function test (impedance aggregometry), in silico prediction, and qRT-PCR validation analysis were performed. 103 patients with Wilson's disease and 52 age, gender-matched control individuals were included. Results: a) In silico prediction: Pathway enrichment analysis showed that Platelet activation, signaling and aggregation and Platelet degradation were identified on the 3rd and 4th place in terms of significance in WD based on genes network analysis. We identified 5 miRNAs, top targets from gene WD and Fibrosis and ATP7B gene, 4 lncRNAs and 9 circRNAs were identified. The in silico results also suggest that ncRNAs play a critical role in pathophysiology of liver fibrosis due to increased platelet activation (fig1). b) platelet activation: Impedance aggregometry showed that patients with hepatic form had significantly higher platelet activation than control in both TRAP and AA-induced test ($p=0.02$; $p=0.03$, respectively). c) qPCR: MALAT, HOTAIR and H19 lncRNAs expressions were found significantly higher in hepatic-involved patients than the control ($p=0.003$, $p=0.04$, $p=0.001$, respectively) (fig2). Conclusion: Pathway enrichment analysis supported our hypothesis and wet-lab analysis validated the role of platelet activity in WD pathology. For the first time, we found increased platelet activation, and platelet-related lncRNAs in WD patients with hepatic form compared to healthy individuals. Our results may provide for the first time knowledge on the molecular background of platelets reactivity along with ncRNAs interactions in contribution to clinical manifestation of WD focusing on its role in liver fibrosis processes. Funding: NCN: 2022/44/C/NZ2/00143

Kardioprotekcyjne działanie empagliflozyny poprzez szlak sirtuiny-ncRNA po zawale mięśnia sercowego

Anna Nowak-Szwed^{1,2}, Zofia Wicik^{1,2,3}, Ceren Eyileten^{1,2}, Sara Ahmadova^{1,2}, Jolanta Siller-Matula⁴, Dirk von Lewinski⁵, Harald Sourij⁶, Marek Postuła^{1,2}

¹⁾ Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii CEPT, Warszawa, Polska

³⁾ Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, Polska

⁴⁾ Klinika Kardiologii II, Uniwersytet Medyczny w Wiedniu, Wiedeń, Austria

⁵⁾ Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Graz, Graz, Austria

⁶⁾ Klinika Endokrynologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny w Graz, Graz, Austria

Wstęp: Badania wykazały bezpośrednie kardioprotekcyjne działanie inhibitorów SGLT2, jednak dokładne mechanizmy molekularne tego efektu nadal nie są w pełni zbadane. Na podstawie analizy in silico wysunęliśmy hipotezę, że kardioprotekcyjne działanie inhibitorów SGLT2 wynika z zwiększonego poziomu ekspresji sirtuin oraz ich regulatorów miRNA.

Metodologia: Przeprowadzono analizę przewidywania in silico, wykorzystując podejście obliczeniowe, które obejmowało: (I) identyfikację i ranking najbardziej obiecujących ncRNA związanych z drogami sygnałowymi sirtuin oraz SGLT2; (II) wyłonienie kluczowych miRNA poprzez przygotowanie list genów obejmujących: wszystkie geny SIRT; interaktory SGLT2 pierwszego i drugiego poziomu; selekcję genów na podstawie Gene Ontology zaangażowanych w procesy zapalne, fibrozę, stres oksydacyjny oraz hipoksję-iskamię; geny związane z zawałem mięśnia sercowego i niewydolnością serca, bazując na bazie danych DisGeNet. Następnie wykonano walidację analizy qRT-PCR. Próbkę pacjentów pochodziły z podwójnie ślepego badania klinicznego EMMY (NCT03087773). Każda grupa liczyła 24 pacjentów (empagliflozyna=24; placebo=24), plasma została pobrana zarówno na początku badania, jak i po 26 tygodniach leczenia; w analizie pilotażowej wykorzystano łącznie 96 próbek podłużnych.

Wyniki: Analiza in silico wyłoniła 6 miRNA celujących w największą liczbę genów SIRT1-7, SGLT2 oraz interaktorów SGLT2 pierwszego poziomu, a mianowicie miR-34a-5p, miR-27a-3p, miR-302a-3p, miR-146a-5p, miR-182-5p i miR-124-3p (rysunek 1). Analiza qRT-PCR wykazała, że po 26 tygodniach leczenia empagliflozyną, poziomy ekspresji miR-214, miR-34a, miR-146a, miR-182-5p i SIRT2 były znacząco wyższe w porównaniu do poziomów wyjściowych ($p=0,015$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,005$, odpowiednio). Ponadto, stwierdzono, że po 26 tygodniach leczenia, pacjenci przyjmujący empagliflozynę mieli znacząco wyższy poziom ekspresji SIRT6 oraz znacząco niższy poziom ekspresji miR-214 i miR-302a-3p w porównaniu do pacjentów przyjmujących placebo ($p=0,036$; $p=0,007$; $p=0,042$, odpowiednio) (rysunek 2).

Wnioski: Nasze wyniki analizy in silico po raz pierwszy przewidziały sieć interakcji między ncRNA a genami związanymi z niewydolnością serca w kontekście osi SGLT2-sirtuin. Wykazaliśmy, że zgodnie z naszymi przewidywaniami, empagliflozyna, jako inhibitor SGLT2, może wywierać efekt kardioprotekcyjny poprzez molekularny mechanizm działania SIRT2 i SIRT6 oraz ich regulatorów ncRNA.

Echokardiograficzna ocena progresji i odpowiedzi na farmakoterapię indukowanego monokrotaliną nadciśnienia płucnego

Ryszkiewicz Piotr, Marta Baranowska-Kuczko, Anna Pędzińska-Betiuk, Patryk Remiszewski, Barbara Malinowska

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Nadciśnienie płucne (PH) to postępująca i zagrażająca życiu choroba, charakteryzująca się podwyższonym ciśnieniem krwi w tętnicach płucnych, prowadząca do postępującej dysfunkcji i niewydolności prawej komory serca i w konsekwencji do przedwczesnej śmierci. „Złotym standardem” diagnostyki PH jest inwazyjne cewnikowanie prawostronne serca. Jednakże echokardiografia przezklatkowa, jako metoda nieinwazyjna, pozwalająca na wielokrotne powtarzanie pomiarów bez obciążania pacjenta istotnym ryzykiem powikłań, jest wykorzystywana częściej, zarówno w badaniach przesiewowych, jak też w kontroli długoterminowej, po rozpoznaniu PH. Stosowana jest również w modelach doświadczalnych tego schorzenia, umożliwiając obserwację postępujących zmian strukturalnych serca i naczyń płucnych, a także ocenę funkcji prawej komory i przepływów krwi.

Celem niniejszych badań wstępnych była ocena, czy dobór zwierząt o określonym zakresie wyjściowej masy ciała (BW) ma wpływ na przebieg indukowanego monokrotaliną (MCT, 60 mg/kg, s.c.) nadciśnienia płucnego, jak również na efekt leczniczy zastosowanej farmakoterapii. Doświadczenia przeprowadzono na szczurach Wistar z trzech zakresów początkowej masy ciała (BW): 200-219 g, 220-239 g i 240-260 g. W każdej z grup oceniano zwierzęta z wyindukowanym PH (otrzymujące terapię referencyjną [ambrisentan+adalafil, 10+10 mg/kg, p.o, przez 21 dni] lub odpowiedni rozpuszczalnik) i kontrolne (bez PH). Pomiarów echokardiograficznych dokonywano bezpośrednio przed wdrożeniem leczenia (w dniu 7) i na zakończenie protokołu doświadczalnego (w dniu 28 od podania MCT). U szczurów z PH ze wszystkich zakresów BW stwierdzono w dniu 28 w stosunku do dnia 7 wzrost średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP), powierzchni przekroju poprzecznego prawej komory na końcu rozkurczu (RVEDA) i grubości jej ściany (RVWT), natomiast obniżenie czasu przyspieszenia przepływu przez zastawkę pnia płucnego (PAT) i stosunku PAT do czasu wyrzutu krwi z prawej komory (PAT/PET). Zmiany te były przy tym najsilniej zaznaczone w grupie 200-219 g, natomiast najslabiej w grupie 240-260 g. Zastosowana farmakoterapia referencyjna zmniejszała niekorzystne działanie MCT w obrębie ocenianych parametrów, przy czym w największym stopniu w grupie 220-239 g.

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że odpowiedni dobór wyjściowej masy ciała szczurów ma wpływ zarówno na rozwój PH w modelu indukowanym monokrotaliną, jak też na odpowiedź na farmakoterapię, co należy uwzględniać przy planowaniu protokołów doświadczalnych. Echokardiografia przezklatkowa może być przy tym uznana za użyteczną metodę detekcji tego rodzaju różnic.

Finansowanie: Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie umowy numer UMO-2021/41/B/NZ7/03757 i Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, B.SUB.24.236

Ocena wpływu SSR 504734 na pobudliwość drgawkową i działanie wybranych leków przeciwdrgawkowych u myszy

Nikoła Gapińska^{1,2}, Piotr Wlaź¹, Marcin Jakubiec³, Michał Abram³, Krzysztof Kamiński³, Katarzyna Ciepiela^{3,4}, Elżbieta Wyska⁵, Alan González Ibarra⁶, Dawid Krokowski⁶, Marek Tchórzewski⁶, Katarzyna Socła¹

1) Katedra Fizjologii Zwierząt i Farmakologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,

2) Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet

3) Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

4) Selvita S.A., ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Polska

5) Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

6) Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Padaczka to przewlekłe zaburzenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), które charakteryzuje się spontanicznymi i nawracającymi napadami drgawkowymi powstającymi na skutek nadmiernych wyładowań bioelektrycznych w mózgu. Padaczka ze względu na bardzo złożony patomechanizm oraz komórkowe i molekularne podłoże, często ogranicza skuteczność terapeutyczną dostępnych na rynku ponad 30 leków przeciwpadaczkowych. W związku z tym zachodzi potrzeba poszukiwania nowych mechanizmów molekularnych zaangażowanych w patomechanizm padaczki oraz nowych sposobów jej leczenia.

Transporter glicyny typu 1 (GlyT1) jest homeostatycznym regulatorem poziomu glicyny w OUN ssaków. GlyT1 poprzez kontrolowanie wychwytu zwrotnego glicyny w synapsach bierze udział zarówno w regulacji pobudzającej - glutaminianergicznej, jak i hamującej – glicynergicznej. Kontrolując w ten sposób pozakomórkowe stężenia glicyny, inhibitory GlyT1 mogą oddziaływać na równowagę pobudzenia/hamowania, a tym samym wpływać na pobudliwość drgawkową. Jednakże dane dotyczące roli GlyT1 w padaczce są bardzo ograniczone.

Celem niniejszych badań było zbadanie wpływu SSR 504734, selektywnego inhibitora GlyT1, na progi drgawkowe w trzech modelach drgawek ostrych u myszy, a także oraz ochronne działanie sześciu standardowych leków przeciwdrgawkowych.

SSR 504734 podawany jednokrotnie znacząco podwyższył próg tonicznego wyprostu kończyn tylnych w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MEST). Związek ten nie wpłynął jednak na próg drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz, a także na próg drgawek mioklonicznych, klonicznych i tonicznych w teście drgawek indukowanych dożylną infuzją PTZ. Analiza zawartości aminokwasów w strukturach mózgu wykazała istotny spadek stężenia tyrozyny w pniu mózgu oraz spadek stężenia glicyny w hipokampie.

Podobnie SSR 504734 podawany przez 14 dni podwyższył próg drgawek tonicznych w teście MEST, ale był nieskuteczny w przypadku napadów psychomotorycznych oraz w teście ivPTZ. Analiza zawartości aminokwasów w strukturach mózgu wykazała istotny wzrost stężenia glicyny w pniu mózgu, seryny w korze mózgowej oraz lizyny w hipokampie.

Ponadto SSR 504734 nasilał ochronne działanie karbamazepiny i lewetyracetamu w teście 6 Hz (32 mA), lamotryginy i topiramatu w teście MES oraz walproinianu w teście scPTZ u myszy. SSR 504734 nie wpłynął natomiast na aktywność etosuksymidu ocenianą w teście scPTZ.

Projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki UMO-2021/41/B/NZ7/00328.

Modulacja układu endokannabinoidowego a objawy charakterystyczne dla schizofrenii – efekt działania β -kariofilenu w zwierzęcym modelu choroby

Magdalena Białoń, Katarzyna Popiołek-Barczyk, Żaneta Michalec-Warzecha, Katarzyna Starowicz

Zakład Neurochemii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Schizofrenia jest przewlekłą chorobą psychiczną dotykającą około 1% populacji ogólnej i jest jedną z chorób prowadzących do znacznego obniżenia jakości życia pacjentów oraz skrócenia prognozowanej długości życia. Do symptomów choroby można zaliczyć objawy wytwórcze (np. halucynacje), negatywne (np. zubożenie mowy) oraz kognitywne (np. zaburzenia pamięci). Obecnie farmakoterapia schizofrenii opiera się na stosowaniu leków przeciwpsychotycznych: typowych oraz atypowych. Obie grupy związków stosowane w leczeniu, związane są z wysokim ryzykiem wystąpienia skutków ubocznych, jak np. zaburzenia motoryczne czy zespół metaboliczny. Co więcej, leki przeciwpsychotyczne są w stanie skutecznie niwelować symptomy wytwórcze choroby, natomiast wykazują niską skuteczność w przypadku objawów negatywnych i kognitywnych. Z tego też powodu istotne jest ciągle poszukiwanie nowych, bezpiecznych leków, które swoim działaniem będą w stanie objąć większy zakres symptomów schizofrenii. W tym celu wykorzystuje się modele zwierzęce, dzięki którym jesteśmy w stanie odwzorować objawy choroby, a tym samym weryfikować skuteczność badanych związków w niwelowaniu ich.

Najnowsze badania wskazują na zaangażowanie układu endokannabinoidowego w szereg zaburzeń psychicznych, w tym schizofrenii. Szczególną uwagę warto poświęcić receptorowi kannabinoidowemu typu 2 (CB2R), którego aktywacja nie prowadzi do wywołania efektów psychotycznych, w przeciwieństwie do aktywacji CB1R. Dlatego też, CB2R może stać się obiecującym celem w terapii chorób psychicznych. Jedną z substancji, która potencjalnie mogłaby wykazywać skuteczne zmniejszenie symptomów schizofrenii i jednocześnie jest agonistą CB2R jest β -kariofilen (BCP), seskwiterpen występujący naturalnie w konopiach indyjskich, czarnym pieprzu czy bazylii. Literatura naukowa wskazuje na przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz przeciwłękowe działanie BCP, np. w zwierzęcych modelach depresji czy bólu neuropatycznego. Co więcej, substancja ta wykazuje wysoki profil bezpieczeństwa, co zostało potwierdzone w przeprowadzonym przez nas badaniu *in vitro*. W kontekście omawianej choroby, szczególnie istotne wydaje się być przeciwzapalne działanie BCP, ze względu na fakt, iż u pacjentów cierpiących na schizofrenię zaobserwowano zwiększone poziomy czynników pro-zapalnych, korelujących z nasileniem objawów choroby. Dodatkowo, jedną z teorii wyjaśniających rozwój choroby jest właśnie teoria stanu zapalnego – wskazująca na istotną rolę czynników pro- i przeciwzapalnych w etiologii schizofrenii.

W prowadzonych przez nas badaniach skupiamy się na potencjalnym, przeciwpsychotycznym efekcie BCP, ocenianym w indukowanym farmakologicznym modelu schizofrenii u szczurów. Badania mają na celu poszukiwanie nowej i bezpiecznej farmakoterapii, która mogłaby stanowić alternatywną metodę leczenia dla stosowanych leków przeciwpsychotycznych bądź uzupełnienie klasycznej farmakoterapii, prowadząc jednocześnie do zniwelowania skutków ubocznych przyjmowanych leków.

SESJA PLAKATOWA

Ocena działania łącznego chronicznego podawania aripiprazolu z N-acetylocysteiną w neurorozwojowym modelu schizofrenii

Zofia Rogóż^{1,2}, Kinga Kamińska¹, Elżbieta Lorenc – Koci¹

¹⁾ Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN

²⁾ Akademia Nauk Stosowanych w Nowym Targu, Instytut Zdrowia, kierunek kosmetologia

Wstęp: Schizofrenia jest zaburzeniem psychicznym zaliczanym do psychoz endogennych, z którą zmagają się od 0,5 do 1% populacji. Schizofrenia nazywana jest chorobą wieku młodzieńczego, gdyż pierwsze epizody psychoz pojawiają się w okresie młodzieńczym, tj. między 15 a 20 rokiem życia. Objawy chorobowe dla schizofrenii można podzielić na trzy główne grupy: objawy pozytywne (nadpobudliwość ruchowa i psychiczna, gonitwa myśli, urojenia, omamy wzrokowe i słuchowe, halucynacje), objawy negatywne, to przede wszystkim zaburzenia emocjonalne, wycofanie z życia społecznego i rodzinnego, obniżenie aktywności fizycznej i umysłowej. Ostatnia grupa objawów, to zaburzenie funkcji poznawczych (zaburzenie koncentracji, nauki, pamięci i przetwarzanie informacji). Etiologia schizofrenii jest bardzo złożona i nie do końca poznana. Sugeruje się, że czynniki genetyczne, środowiskowe, a także czynniki prenatalne i nieprawidłowości w czasie ciąży oraz na wczesnym etapie życia postnatalnego mogą mieć znaczenie w jej ujawnieniu się. Mimo wielu lat badań, objawy negatywne i zaburzone procesy poznawcze stanowią dla klinicystów poważny problem terapeutyczny. Przedkliniczne i kliniczne badania wykazały, że aripiprazol (ARI), atypowym lekiem przeciwpsychotycznym, wykazuje częściowe agonistyczne działanie w stosunku do receptorów dopaminowych D2 i 5-HT1A oraz słabsze antagonistyczne działanie do receptorów dopaminowych D2. N-acetylocysteina (NAC) jest dobrze znanym antyoksydantem.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu ARI (0,1 i 0,3 mg/kg, ip) oraz NAC (10 i 30 mg/kg, po) na objawy przypominające schizofrenie w modelu neurorozwojowym, wywołanym podaniem inhibitora syntezy glutationu (BSO, 3,8 mmol/kg, sc) z inhibitorem wychwytu dopaminy (GBR 12909, 5 mg/kg, sc) noworodkom samcom szczurów rasy Sprague-Dawley między 5 a 16 dniem życia.

Metody: ARI i NAC podawano oddzielnie i łącznie dorosłym szczurom przez 21 dni przed testem. Badania behawioralne (test interakcji socjalnej i rozpoznania nowego obiektu) wykonano u dorosłych szczurów między 88 a 90 dniem życia.

Wyniki: ARI zastosowany w wyższej dawce (0,3 mg/kg) oraz NAC (30 mg/kg) znoszą deficyty zachowań w teście interakcji socjalnej, czas interakcji oraz liczbę interakcji, natomiast w teście rozpoznania nowego obiektu zwiększają zainteresowanie nowym obiektem porównując z grupą kontrolną. Łączne zastosowanie nieaktywnych dawek ARI (0,1 mg/kg) z NAC (10 mg/kg) spowodowało całkowite zniesienie behawioralnych deficytów w zastosowanym modelu neurorozwojowym.

Wnioski: Uzyskane wyniki wykazały, że NAC w nieefektywnej dawce nasila działanie przeciwpsychotyczne nieefektywnej dawki ARI oraz, że ta strategia skojarzonej terapii może stanowić propozycję dla klinicystów w celu zmniejszenia dawek terapeutycznych przy leczeniu pacjentów schizofrenicznych, zwłaszcza przy leczeniu objawów negatywnych oraz zaburzonych procesów poznawczych, które są obserwowane w tej chorobie i stanowią poważny problem terapeutyczny.

Wpływ psylocybiny na aktywność osi HPA szczurów

Izabela Szpręgiel, Agnieszka Bysiek, Krystyna Gołombiowska

Zakład Farmakologii, Zespół II, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Doniesienia kliniczne sugerują, że psylocybina może być stosowana jako szybko działający lek przeciwdepresyjny, jednak jej mechanizm działania na aktywność osi HPA wciąż nie jest w pełni poznany.

Celem badań było określenie wpływu pojedynczej dawki psylocybiny (0.6 mg/kg) na poziomy monoamin w homogenatach podwzgórza (HT) i nadnerczy (ND) szczurów przy użyciu HPLC. Ponadto, określono stężenie kortykosteronu (CRT) w surowicy metodą ELISA.

Psylocybina znacząco zwiększyła poziom dopaminy (DA) bez wpływu na poziom noradrenaliny (NA), serotoniny (5-HT) oraz ich metabolitów DOPAC, HVA i 5HIAA mierzonych 7 dni po podaniu w tkance podwzgórza. W nadnerczach szczurów nie zaobserwowano żadnego wpływu psylocybiny na tkankowe poziomy NA, adrenaliny (ADR), DA i 5-HT. Stężenie CRT w surowicy istotnie zmniejszyło się 7 dni po podaniu psylocybiny.

Uzyskane wyniki wskazują, że psylocybina może modulować funkcję osi HPA poprzez bezpośrednią modulację szlaku DA w podwzgórzu. Wpływ psylocybiny na oś HPA może leżeć u podstaw przeciwdepresyjnego działania psychodelików.

Wpływ psylocybiny na uwalnianie neuroprzekaźników w korze czołowej szczurów poddanych chronicznemu łagodnemu stresowi

Agnieszka Bysiek, Izabela Szpręgiel, Krystyna Gołombiowska

Zakład Farmakologii, Zespół II, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Zaburzenia nastroju i stany lękowe są jednym z najczęstszych zagrożeń zdrowia psychicznego, a jednocześnie charakteryzują się wysokim poziomem chorób współistniejących. Psylocybina, jako selektywny agonista receptora 5-HT_{2A}, wydaje się wykazywać szybkie działanie przeciwdepresyjne i przeciwłękowe w porównaniu z obecnie stosowanymi lekami przeciwdepresyjnymi.

Celem badania było określenie wpływu jednorazowego podania psylocybiny w dawce 0.6mg/kg na uwalnianie *in vivo* noradrenaliny (NA), dopaminy (DA), serotoniny (5-HT), glutaminianu (GLU) i kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w korze czołowej szczurów poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu. Pozakomórkowy poziom neuroprzekaźników mierzono za pomocą UHPLC z detekcją elektrochemiczną.

Pod wpływem stresu obserwowano wzrost uwalniania DA, 5-HT i GABA, lecz nie NA i GLU, którego poziom był obniżony w stosunku do grupy niestresowanej. Psylocybina zmniejszała zwiększone stresem uwalnianie DA, 5-HT i GABA, lecz nie wpływała na uwalnianie NA i GLU. Uzyskane wyniki sugerują, że stres może powodować dysfunkcję receptora 5-HT_{2A} i w tych warunkach za hamujący wpływ psylocybiny na uwalnianie DA, 5-HT i GABA może odpowiadać receptor 5-HT_{1A} w korze czołowej.

Wpływ kwasu azjatykowego na działanie leków przeciwdepresyjnych

Ewa Poleszak¹, Anna Serefko², Sylwia Wośko³, Aleksandra Szopa², Weronika Słotwińska⁴, Andrea Weronika Gieleta⁵, Dorota Ołtarzewska⁶, Jarosław Szponar⁷, Agnieszka Czyłkowska⁸, Bernadeta Szewczyk⁹

- 1) Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej; Pracownia Badań Przedklinicznych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- 2) Zakład Farmacji Klinicznej i Opieki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- 3) Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej; Pracownia Badań Przedklinicznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- 4) Studenckie Koło Naukowe; Wydział Lekarski UM w Lublinie
- 5) Wydział Medycyny i Chirurgii, Uniwersytet Malta
- 6) Szpital SP ZOZ MSWiA w Lublinie
- 7) WSzS im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego SPOZ, Klinika Toksykologii
- 8) Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
- 9) Zakład Neurobiologii, Instytut Farmakologii im J. Maja, Polska Akademia Nauk

Cel:

Depresja to jeden z najczęstszych problemów zdrowotnych na świecie, który może dotknąć zarówno kobiety, jak i mężczyzn, niezależnie od wieku. Niestety, optymalne leczenie tej choroby nadal stanowi istotne wyzwanie dla lekarzy. Ze względu na ograniczoną skuteczność, oporność na leczenie i uciążliwe działania niepożądane, które są główną przyczyną przerywania leczenia przez pacjentów, konwencjonalne leki przeciwdepresyjne wydają się niewystarczające w leczeniu depresji. Dlatego ciągle trwają poszukiwania innych, nowych strategii leczenia. Testowane są nowe związki, a także nowe kombinacje dobrze znanych leków. Całkiem niedawno uwagę naukowców zwrócił kwas azjatycki, który charakteryzuje się wielokierunkowym działaniem biologicznym. Według danych literaturowych środek ten oddziałuje na około 100 różnych celów molekularnych, z których wiele jest istotnych dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Dlatego też celem wykonanych badań, była ocena działania przeciwdepresyjnego kwasu azjatykowego oraz jego wpływu na działanie wybranych leków przeciwdepresyjnych, tj. imipraminy, reboksetyny, escitalopramu i agomelatyny.

Metody

Doświadczenia przeprowadzono na samcach myszy Albino Swiss. Wykonano test zawieszenia za ogon (TST) oraz oceniono spontaniczną aktywność lokomotoryczną zwierząt za pomocą automatycznego aktymetru.

Wyniki

Z uzyskanych wyników wynika, że kwas azjatycki w dawce 10 i 20 mg/kg wykazuje działanie przeciwdepresyjne. Ponadto w dawce subaktywnej (5 mg/kg) znacząco nasila działanie przeciwdepresyjne imipraminy (15 mg/kg), escitalopramu (2 mg/kg) i agomelatyny (20 mg/kg) w TST u myszy, natomiast nie wpływa na działanie reboksetyny (2,5 mg/kg). Co ważne, ani sam kwas azjatykowy, ani podany z lekami przeciwdepresyjnymi nie wpływał na spontaniczną aktywność lokomotoryczną badanych zwierząt, co oznacza, że zachowanie zwierząt obserwowane w TST nie wynikało z ich potencjalnej nadmiernej lokomocji.

Wnioski

Wyniki uzyskanych badań wskazują na potencjalną użyteczność kwasu azjatykowego w leczeniu depresji, zarówno w monoterapii, jak i jako dodatek do konwencjonalnych leków. Jednak na obecnym etapie wymagane są dalsze badania przedkliniczne, aby w przyszłości potwierdzić potencjał kwasu azjatyckiego w badaniach klinicznych

Szczegółowa ocena rozwoju wokalizacji osesków w neurorozwojowym modelu schizofrenii

Agnieszka Potasiewicz

Zakład Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja, Polska Akademia Nauk

Schizofrenia jest zazwyczaj diagnozowana na początku dorosłości, lecz subtelne deficyty komunikacyjne i w funkcjonowaniu społecznym często są zauważalne już od wczesnego dzieciństwa. Pomimo tego, mało wiemy o występowaniu deficytów komunikacyjnych u gryzoni w wczesnych etapach życia w modelach schizofrenii. Zdolności komunikacyjne szczurów laboratoryjnych można ocenić, badając ich ultradźwiękowe wokalizacje (USV). Neonatalne szczury, znajdując się w sytuacji oddzielenia od matki i gniazda, intensywnie wokalizują, aby przywołać matkę i zwiększyć swoje szanse na przetrwanie. Te wczesne USV mogą również służyć jako wskaźnik siły więzi z matką.

W neurorozwojowym modelu schizofrenii, który wykorzystuje prenatalne podanie octanu metylazoksymetanolu (MAM; 22 mg/kg; w 17. dniu ciąży), przeprowadziliśmy szczegółową analizę wokalizacji neonatalnych szczurów (w wieku 6, 9 i 12 dni). Emisję USV wywołało oddzielenie młodych od matki. Analiza USV skupiła się na ocenie kluczowych parametrów charakteryzujących te sygnały, takich jak liczba emitowanych USV, dominująca częstotliwość, zakres częstotliwości, średni czas trwania, a także na organizacji czasowej i klasyfikacji USV na poszczególne podtypy.

Wyniki wskazują, że wraz z upływem czasu parametry akustyczne ultradźwiękowych sygnałów wokalnych (USV) ulegają zmianom, co prowadzi do wykształcenia się bardziej złożonego i wyszukanego repertuaru sygnałów. W miarę upływu czasu, oseski kontrolne emitują krótsze USV o wyższej częstotliwości i zwiększonej modulacji (dzień 9 i 12 w porównaniu do dnia 6). Tego efektu nie obserwujemy u szczurów MAM. Osobniki MAM wokalizowały w sposób porównywalny do zwierząt kontrolnych w 6. i 9. dniu życia. Jednakże w 12. dniu życia, szczury MAM emitowały mniej liczne USV, które charakteryzowały się dłuższym czasem trwania i niższą częstotliwością niż u zwierząt kontrolnych.

Analizując to, jak rozkładają się dźwięki w czasie, zauważyliśmy, że USV emitowane przez szczury z grupy kontrolnej tworzą najpierw uporządkowany ciąg, czyli sekwencje, a potem większe grupy, które nazywamy partiami. Osobniki MAM rozpoczynają emisję USV w podobnym czasie co kontrolne, jednak przerwy między USV są dłuższe. Skutkuje to tym, że ich USV nie układają się w sekwencje czy partie, lecz emitowane są równomiernie od początku do końca nagrania.

Bezwzględnie na wiek oseska procentowy udział poszczególnych podtypów USV nie różnił się między badanymi grupami. Zmiany w wokalizacji zwierząt MAM, były charakterystyczne dla obu płci.

Podsumowując, prenatalna ekspozycja na MAM prowadzi do zaburzeń w komunikacji akustycznej już na wczesnych etapach życia szczurów. Stopień intensywności tych zaburzeń różni się jednak w zależności od wieku potomstwa. Przeprowadzone badania umożliwiają głębsze zrozumienie rozwoju wokalizacji u młodych gryzoni.

Badanie zostało sfinansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki: 2016/23/B/NZ7/01131.

Deficyty motywacji u szczurów w teście wyboru opartego na wysiłku - potencjalny model zaburzeń nawiązujących do apatii

Natalia Malikowska-Racia, Piotr Popik

Zakład Badań Nowych Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Apatia jest stanem obniżonej wrażliwości na bodźce emocjonalne i fizyczne, której towarzyszy utrata zainteresowań oraz obniżenie aktywności psychicznej i fizycznej. Tym samym, apatia jest jednym z głównych objawów depresji i towarzyszy m.in. chorobom neurodegeneracyjnym. Jedną z potencjalnych przyczyn apatii są deficyty motywacyjne związane z nieadekwatną oceną wielkości nagrody i wymaganego do jej osiągnięcia wysiłku.

Aby zbadać ten fenomen, przeprowadzono serię testów wyboru opartego na wysiłku (effort-based choice, EBC). Zastosowano metodę zaproponowaną przez Schweimer & Hauber (2005), która wykorzystuje schemat uczenia z progresywnym rozkładem wzmocnień (progressive ratio, PROG/chow). Zbadano wpływ poziomu sytości i dostępność alternatywnej, mniej atrakcyjnej, nagrody pokarmowej na alokację wysiłku i proces podejmowania decyzji u szczurów. Następnie zbadano wpływ podania tetrabenazyny, odwracalnego inhibitora pęcherzykowego transportera monoamin VMAT2, na zachowanie szczurów w teście EBC. Etap ten weryfikuje czy podanie tetrabenazyny może stanowić podstawę farmakologicznego modelu zaburzeń motywacji u szczurów w zaproponowanym wariantcie testu EBC (Nunes et al. 2013, Randall et al. 2014). Zbadaliśmy także jak podanie psychostymulującej amfetaminy wpływa na ukierunkowanie i intensywność wysiłku w teście EBC w warunkach kontrolnych i po podaniu tetrabenazyny.

Sytość oraz podanie tetrabenazyny obniżały intensywność pracy szczurów w teście PROG, na co wskazywała redukcja liczby naciśnień na dźwignię gwarantującą dostarczenie nagrody. Dostępność dodatkowego, mniej atrakcyjnego pokarmu (EBC) również znacząco obniżała intensywność pracy, tzn. szczury częściej wybierały mniej smaczną, ale niewymagającą wysiłku nagrodę. Podanie tetrabenazyny potęgowało ten efekt, ale nie zmniejszyło konsumpcji wolno-dostępnego pokarmu. Amfetamina wykazała efekt odwrotny – szczury po jej podaniu były skłonne do włożenia dużo większej pracy, aby uzyskać atrakcyjną nagrodę pokarmową. Amfetamina zmniejszała też spożycie wolno-dostępnej karmy w teście EBC oraz odwracała deficyty po podaniu tetrabenazyny.

Opisane badanie potwierdza dotychczasowe doniesienia o roli tetrabenazyny w modelach wyboru opartego na wysiłku (Salamone et al. 2018). Badanie wykazało także, że podanie tetrabenazyny może stanowić podstawę farmakologicznego modelu zaburzeń motywacji dla wcześniej opisanego metody PROG/chow (Schweimer & Hauber 2005, Sommer et al. 2014).

Bibliografia

Nunes i wsp. (2013) Journal of Neuroscience. 33: 19120–19130; Randall i wsp. (2014) PloS One. 9.; Schweimer i Hauber (2005) Learning and Memory. 12: 334–342.; Salamone i wsp. (2018) Pharmacological Reviews. 70: 747–762.; Sommer i wsp. (2014) Journal of Neuropsychopharmacology. 17: 2045–2056.

Połączone podanie skopolaminy oraz NAM receptora mGlu2 jako potencjalna strategia leczenia depresji

Yana Babii, Agnieszka Pałucha-Poniewiera, Grzegorz Burnat, Andrzej Pilc

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Depresja jest chronicznym, ciężkim i nawracającym zaburzeniem. Pomimo dużej różnorodności leków przeciwdepresyjnych dostępnych na rynku, nadal istnieje ogromne zapotrzebowanie na alternatywne terapie przeciwdepresyjne, które charakteryzowałyby się szybkim początkiem działania oraz długotrwałymi efektami terapeutycznymi, jednocześnie wywołując mniej skutków niepożądanych.

Nową nadzieją w leczeniu depresji są substancje halucynogenne, takie jak na przykład skopolamina – nieselektywny antagonist receptorów muskarynowych należący do podklasy deliriantów. Jedną z prób wyjaśnienia etiologii depresji jest hipoteza cholinergiczna zakładająca, że podwyższona aktywność układu cholinergicznego może być podstawą tego zaburzenia. Doniesienia kliniczne sugerują silne działanie przeciwdepresyjne skopolaminy, które pojawia się już po kilku dniach leczenia. Jednak wciąż niepokojącą kwestią są jej działania niepożądane. Jedną z potencjalnych opcji terapeutycznych, która pozwoliłaby zredukować niepożądane skutki skopolaminy, jest współpodawanie skopolaminy w dawkach podprogowych z innymi substancjami o podobnych właściwościach przeciwdepresyjnych.

Wyniki naszych badań wskazują, że negatywna modulacja metabotropowego receptora glutaminergicznego mGlu2 wywołuje szybkie i stosunkowo długotrwałe efekty podobne do przeciwdepresyjnych w mysim modelu depresji wywołanej procedurą nieprzewidywalnego chronicznego łagodnego stresu. Co więcej, subchroniczne współpodawanie skopolaminy z negatywnym modulatorem allosterycznym (NAM) receptora mGlu2 w dawkach podprogowych również odwraca objawy podobne do depresji wywołane chronicznym stresem, takie jak anhedonia czy apatia. Wstępne badania *in vitro* sugerują, że obserwowane efekty behawioralne mogą wynikać z potencjalnej interakcji pomiędzy receptorami muskarynowymi a mGlu2.

Uzyskane wyniki sugerują, że potencjalizacja efektów terapeutycznych skopolaminy poprzez jej łączone podania z NAM mGlu2 w dawkach podprogowych może stanowić dobrą alternatywę dla stosowania samej skopolaminy w leczeniu depresji, co pozwoli na zmniejszenie terapeutycznie skutecznej dawki. Niemniej jednak, potrzebne są dalsze badania w celu pełnego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych efektów przeciwdepresyjnych.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant nr 2020/37/B/NZ7/03499 (prof. dr hab. Andrzej Pilc).

Kwas protokatechowy zmniejsza deficyty behawioralne w mysim modelu zespołu stresu pourazowego

Jolanta Orzelska-Górka¹, Katarzyna Dos Santos Szewczyk², Ewa Kędzierska¹, Marta Kruk-Słomka¹, Grażyna Biała¹

¹) Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²) Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Zespół stresu pourazowego (ang. post-traumatic stress disorder, PTSD) to przewlekłe zaburzenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), które powstaje w wyniku narażenia na traumatyczne wydarzenia. Do najczęstszych objawów obserwowanych u pacjentów z PTSD należą objawy depresyjne, lękowe oraz zaburzenia poznawcze. Niestety, tylko około 30% pacjentów z PTSD osiąga pełną remisję dzięki zastosowaniu dostępnych leków. Dlatego też istnieje wyraźna potrzeba opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków jako alternatywnej i/lub uzupełniającej terapii PTSD. Kwas protokatechowy (ang. protocatechuic acid, PCA) to jeden z polifenoli występujący w niecierpku gruczołowym (łac. *Impatiens glandulifera*). Nasze poprzednie eksperymenty wykazały, że PCA posiada potencjalne działanie przeciwdepresyjne u myszy w teście wymuszonego pływania oraz, że ta właściwość PCA jest zależna od układu monoaminergiczny oraz że jest związana ze zwiększeniem poziomu neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Ponadto wykazaliśmy, że PCA po długotrwałym podawaniu, przez 14 dni, wykazuje właściwości prokognitywne i przeciwlękowe, które korelują ze wzrostem poziomu serotoniny w surowicy u myszy.

Celem prezentowanego badania była ocena wpływu PCA na zaburzenia behawioralne (lęk i zaburzenia pamięci) wywołane pojedynczym, ale długotrwałym stresem (ang. a mouse single prolonged stress mSPS) u myszy – model PTSD u gryzoni.

Procedura mSPS: myszy poddano działaniu serii krótkich stresorów – przetrzymywano je przez 2 godziny w probówkach z pleksiglasu z małymi otworami (50 ml), umieszczano w szklanych zlewkach i zanurzano po kilka osobników w wodzie (23-25°C; 10 min), zamieniono ich ściółkę na ściółkę pobraną z klatek szczurów (15 min), na koniec zwierzęta poddano działaniu bezwodnego eteru dietylowego do momentu utraty przytomności (ok. 2-3 min). Po siedmiu dniach od ekspozycji na mSPS rozpoczęto podawanie substancji (przez kolejne 14 dni). Następnie zwierzęta poddano testom behawioralnym: testowi podniesionego labiryntu krzyżowego i rozpoznawaniu nowego przedmiotu.

Zwierzęta poddane procedurze mSPS, którym podawano przewlekle PCA (3,75 i 7,5 mg/kg), częściej wchodziły do otwartych ramion labiryntu i spędzały tam więcej czasu w porównaniu z grupą kontrolną mSPS otrzymującą przewlekle sól fizjologiczną. Ponadto, PCA w dawce 3,75 mg/kg złagodził zaburzenia pamięci, wyraźnie obserwowane w grupie mSPS, w teście rozpoznawania nowego przedmiotu.

Podsumowując, nasze wyniki sugerują, iż PCA może łagodzić zarówno zaburzenia lękowe, jak i pamięci wywołane procedurą mSPS – modelem PTSD u myszy.

M-5MPEP, częściowy modulator receptora mGlu5 indukuje szybkie działanie przeciwdepresyjne w mechanizmie zależnym od BDNF

Anna Rafało-Ulińska, Michał Santocki, Agnieszka Pałucha-Poniewiera

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polska Akademia Nauk

Badania wykazały, że receptor mGlu5 jest związany z patofizjologią depresji i mechanizmem działania leków przeciwdepresyjnych. Antagoniści i częściowi, negatywni modulatorzy allosteryczni (NAM) receptora mGlu5, taki jak MPEP i MTEP, wykazują potencjalne działanie przeciwdepresyjne w modelach zwierzęcych, ale ich kliniczne zastosowanie jest ograniczone przez efekty uboczne, takie jak dysfunkcje poznawcze i efekty psychotomimetyczne. MPEP nasilał aktywność lokomotoryczną wywołaną przez fencyklidynę i zakłócał inhibicję pre-pulsu. Alternatywą są związki częściowo hamujące odpowiedź receptora mGlu5 na glutaminian, takie jak M-5MPEP, który działa jako częściowy antagonist mGlu5. Badania *in vitro* wykazały, że częściowe NAM mGlu5 blokują mniej niż 100% efektu w porównaniu do pełnych NAM, a ich skuteczność terapeutyczna jest porównywalna. Częściowe NAM mGlu5 mają szersze okno terapeutyczne i nie wywołują efektów psychotomimetycznych.

W przedstawionych badaniach zbadaliśmy, czy częściowy modulator receptora mGlu5, M-5MPEP indukował szybki i trwały efekt podobny do szybko działających leków przeciwdepresyjnych (RAAD) u myszy C57BL/6J. W teście zawieszenia za ogon (TST) M-5MPEP powodował szybkie, zależne od dawki działanie podobne do leku przeciwdepresyjnego. Ponadto, M-5MPEP w dawce 30 mg/kg indukował utrzymujące się działanie. Efekty te wykazano w teście pielęgnacyjnym (splash test), zaprojektowanym do pomiaru stanu apatii oraz w teście TST. Analizy Western blot i ELISA wykazały udział szlaku TrkB/BDNF w efektach działania modulatora M-5MPEP. Wyniki naszych badań wskazują, że częściowy receptor mGlu5 NAM, M-5MPEP, ma właściwości szybko działającego leku przeciwdepresyjnego

Podziękowania: Badania te były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce w ramach grantu OPUS 14 2017/27/B/NZ7/01873/Narodowe Centrum Nauki

Synteza i aktywność farmakologiczna nowych pochodnych arylopiperazyny

Ewa Kędzierska, Ewa Gibuła-Tarłowska, Marta Kruk-Słomka

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Badania przedkliniczne i kliniczne wskazują na receptory serotoninowe 5-HT_{1A} i 5-HT_{2C} jako cel terapeutyczny w poszukiwaniu nowych, skuteczniejszych leków psychotropowych stosowanych w leczeniu depresji, lęku i schizofrenii. Wiadomo również, że prawidłowa regulacja receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2C} wiąże się z poprawą procesów poznawczych i redukcją skutków ubocznych występujących po atypowych lekach przeciwpsychotycznych, co ma szczególne znaczenie w leczeniu schizofrenii [Agid i in. 2008].

Ponadto leki działające poprzez receptory 5-HT_{1A} mają lepszy profil bezpieczeństwa, ponieważ pośrednio modulują neurotransmisję w obszarach mózgu zaangażowanych w rozwój zaburzeń depresyjnych i lękowych: nie powodują uspokojenia, zaburzeń pamięci, nie oddziałują z alkoholem i nie mają potencjału uzależniającego (Nautiyal i Hen 2017). Przykładami takich leków są azapirony, w tym buspiron (pochodna arylopiperazyny, częściowy agonista receptorów 5-HT_{1A}) [Chessick i in. 2006, Akimova i in. 2009], wortioksetyna i wilazodon (również pochodne arylopiperazyny), które należą do modulatorów serotoninowych o dużym powinowactwie do transportera serotoniny i stymulują postsynaptyczne receptory 5-HT_{1A}. Zatem poszukiwanie nowych leków wśród substancji ukierunkowanych na transmisję serotoninową, w szczególności wśród ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2C}, jest w dalszym ciągu bardzo obiecującym kierunkiem rozwoju nowoczesnych i bezpieczniejszych leków psychotropowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu depresji i stanów lękowych (również współwystępujących z innymi chorobami, np. schizofrenią).

Celem pracy było zbadanie potencjalnej aktywności ośrodkowej czterech nowych związków z grupy pochodnych arylopiperazyny wykazujących powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i/lub 5-HT_{2C}. Związki badano w testach behawioralnych stosowanych do przewidywania potencjalnego wpływu na OUN u myszy (po ich podaniu dootrzewnowym lub podskórnym), ze szczególnym naciskiem na działanie przeciwdepresyjne, przeciwlękowe i przeciwpsychotyczne. Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań farmakologicznych potwierdziły takie działanie, dając podstawę do dalszych, rozszerzonych badań.

Agid O, Kapur S, Remington G. Emerging drugs for schizophrenia. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2008

Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry*. 2009 Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2007

Chessick CA, Allen MH, Thase M, Batista Miralha da Cunha AB, Kapczinski FF, de Lima MS, dos Santos Souza JJ. Azapirones for generalized anxiety disorder. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006

Nautiyal KM, Hen R. Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Res*. 2017

Wpływ długotrwałej ekspozycji długotrwałej ekspozycji dorastających myszy na napój energetyzujący i sporadyczne dawki etanolu na funkcjonowanie myszy dorosłych – znaczenie mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) w hipokampie

Joanna Listos¹, Krzysztof Fronc¹, Adrian Pysiewicz¹, Małgorzata Łupina², Marta Kruk-Słomka¹

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej

Obecność w mózgu receptorów dla peptydu glukagonopodobnego-1 (GLP-1) wskazuje na udział peptydu w działaniu centralnego układu nerwowego. Celem niniejszych badań było określenie czy linagliptyna ma wpływ na procesy pamięci u myszy. Linagliptyna jest selektywnym inhibitorem dipeptydylopeptydazy-IV (DPP-IV), tj. enzymu, który w warunkach fizjologicznych hamuje rozkład peptydu GLP-1, tym samym zwiększa jego poziom. W eksperymentach linagliptynę (10 i 20 mg/kg, ip) podawano zarówno jednorazowo, jak i przewlekłe (8 dni). Do oceny procesu zapamiętywania wykorzystano test biernego unikania (the passive avoidance test). Zaburzenia pamięci indukowano podaniem diazepamem (2 mg/kg, ip). Wyniki opracowano statystycznie wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA). Porównania statystyczne pomiędzy grupami wykonano posługując się testem Tukey'a. W teście biernego unikania wykazano, że przewlekłe podawanie wyższej dawki linagliptyny (20 mg/kg) hamowało u myszy zaburzenia pamięci indukowane diazepamem. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można stwierdzić, że przewlekłe podawanie linagliptyny, inhibitora enzymu DPP-IV, może wywoływać działanie prokognitywne w ośrodkowym układzie nerwowym. Niniejsze eksperymenty poszerzają dotychczasową wiedzę w zakresie prokognitywnych właściwości inhibitorów DPP-IV.

Rola GABAB i GAD w regulacji neurochemicznej w zwierzęcym modelu depresji lekoopornej

Agata Korlatowicz¹, Katarzyna Latocha¹, Paulina Pabian¹, Ryszard Bugno², Adam Hogendorf², Tamás Kovács³, Andrzej J. Bojarski², Zoltan Varga³, Agata Faron-Górecka¹

1 Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków, Polska

2 Zakład Chemii Leków, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków, Polska

3 Zakład Farmakologii i Farmakoterapii, Uniwersytet Semmelweis, Budapeszt, Węgry

Depresja lekooporna (TRD) pozostaje jednym z największych wyzwań dla współczesnej psychiatrii, wymagająca rozwijania innowacyjnych podejść terapeutycznych. W ostatnim czasie obserwuje się wzrost zainteresowania naukowców rolą substancji psychodelicznych, takich jak psylocybina (PSI), które mogą przynieść przełom w leczeniu tej złożonej choroby. Wydaje się, że szczególne znaczenie mogą odgrywać struktury takie jak habenula (Hb) oraz kora przedczołowa (PFC), które są kluczowe dla procesów poznawczych i emocjonalnych.

W naszych badaniach został wykorzystany dobrze zwalidowany zwierzęcy model depresji lekoopornej, szczury Wistar Kyoto (WKY). Skupiliśmy się na analizie zmian w ekspresji genów receptora GABA (Gabbr2), kanału potasowego (Kcnj5) oraz podjednostki receptora NMDA (Grin2a), które odgrywają znaczącą rolę w regulacji przewodnictwa neuronalnego i procesów neuroplastyczności, a także są kluczowe dla adaptacyjnych mechanizmów w odpowiedzi na stres i zaburzenia nastroju.

Habenula, składająca się z części bocznej (LHb) i środkowej (MHb), jest istotna dla przetwarzania sygnałów awersyjnych i regulacji emocji. Jej działanie jest ściśle powiązane z PFC, która odpowiada za wyższe funkcje poznawcze oraz regulację emocji. Przekazywanie informacji między tymi strukturami mózgu ma kluczowe znaczenie dla adaptacji behawioralnej w odpowiedzi na stres, oraz dla mechanizmów patologicznych leżących u podstaw depresji.

Uzyskane wyniki wskazują, że u szczurów WKY dochodzi do wzrostu ekspresji badanych genów w Hb, co może być interpretowane jako mechanizm adaptacyjny mający na celu kompensację nadmiernej aktywności neuronalnej, typowej dla stanów depresyjnych. Jednokrotne podanie PSI w dawce 0,3 mg/kg wywołało zauważalne zmiany w ekspresji tych genów, ale różniące się w zależności od regionu: obniżenie ekspresji genu kodującego Kcnj5 w LHb wskazuje na kluczową rolę tego kanału w działaniu przeciwdepresyjnym PSI, podczas gdy zmniejszenie ekspresji Grin2a w MHb oraz obniżenie ekspresji Gabbr2 i Kcnj5 w PFC może świadczyć o ogólnym wpływie PSI na stabilizację aktywności neuronalnej w regionach krytycznych dla procesów poznawczych i emocjonalnych.

Nasze badania potwierdzają kluczowe znaczenie habenuli oraz jej połączeń z korą przedczołową w mechanizmach depresji lekoopornej, a także wskazują na potencjalne nowe ścieżki terapeutyczne, które mogą być wykorzystane w leczeniu TRD.

Badania zostały sfinansowane w ramach działalności statutowej Pracowni Farmakologii Biochemicznej IF PAN w Krakowie.

Ocena aktywności terapeutycznej donora siarkowodoru AP39 w modelu fototrombotycznego ogniskowego zawału mózgu u myszy

Patrycja Rachwał, Jakub Jurczyk, Zuzanna Guzda, Alicja Skórkowska, Bartosz Pomierny, Lucyna Pomierny-Chamioło

Laboratorium Obrazowania, Centrum Rozwoju Terapii Chorób Cywilizacyjnych i Związanych z Wiekami (CDT-CARD), Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Zakład Toksykologii, Katedra Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Udar niedokrwienny jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności i niepełnosprawności na świecie. Dwie trzecie pacjentów to osoby starsze, ale w czasie pandemii COVID-19 drastycznie wzrosła liczba młodych pacjentów, u których dochodzi do epizodów zakrzepowych prowadzących do ciężkiego udaru niedokrwiennego. Skuteczne strategie farmakoterapii w przypadku zawału mózgu wciąż są ograniczone. Mitochondria pełnią kluczową rolę w produkcji energii komórkowej poprzez łańcuch oddechowy. W wyniku niedokrwienia dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów, co skutkuje deficytem energetycznym komórki, wzrostem stężenia glutaminianu i nasileniem zjawiska ekscytotoksyczności. Dane literaturowe sugerują, że siarkowodor może pełnić rolę dawcy elektronów w łańcuchu oddechowym i wpływać na funkcjonalność mitochondriów w chorobach niedokrwiennych.

Celem tego projektu była ocena wpływu podania związku AP39, będącego donorem siarkowodoru ukierunkowanym na mitochondria, na przepływ krwi w mózgu, objętość zawału oraz ekspresję wybranych białek mitochondrialnych w modelu fototrombotycznego ogniskowego niedokrwienia kory mózgowej zarówno u samców jak i u samic myszy.

W badaniu zastosowano model niedokrwienia wywołany dożylnym podaniem rózu bengalskiego i naświetlaniem wybranego obszaru kory mózgowej światłem o długości fali 561 nm. Wystąpienie udaru oraz przepływ krwi w mózgu potwierdzano i monitorowano za pomocą systemu analizy kontrastu plamki lasera (LASCA). AP39 (100 nmol/kg m.c., i.v) podawano 10 minut po wywołaniu niedokrwienia. Objętość zawału oceniano przyżyciowo obrazowaniem MRI oraz post mortem za pomocą barwienia TTC. Ekspresję białek kluczowych dla procesów mitochondrialnych COX IV oraz TOMM20 obrazowano immunofluorescencyjnie na skrawkach sekcji koronalnych mózgu.

Przeprowadzone badania wykazały, że podanie AP39 zredukowało objętość udaru i zwiększyło przepływ naczyniowy w mózgu myszy. Wyniki sugerują, że AP39 może mieć korzystny wpływ w chorobach niedokrwiennych, jednak konieczne są dalsze badania w celu analizy mechanizmu molekularnego jaki stoi za działaniem nowego donora siarkowodoru.

Wpływ wolnego ederavonu i ederavonu zamkniętego w nanokapsułkach na hodowle organotypowe hipokampa w modelu udaru niedokrwiennego mózgu

Beata Grygier¹, Kinga Kamińska¹, Krzysztof Szczepanowicz², Piotr Warszński², Władysław Lason¹, Agnieszka Basta-Kaim¹

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Laboratorium Nanotechnologii, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk

Zaburzenia neurologiczne, w tym udar niedokrwienny mózgu, są główną przyczyną niepełnosprawności fizycznej i psychicznej na całym świecie i obecnie dotyczą około 15% światowej populacji. W ciągu ostatnich 30 lat bezwzględna liczba pacjentów znacznie wzrosła. Co więcej, oczekuje się, że w ciągu najbliższych dwóch dekad obciążenie chorobami neurodegeneracyjnymi wzrośnie co najmniej dwukrotnie.

Za istotne niekorzystne czynniki rozwoju chorób neurodegeneracyjnych uważa się stres oksydacyjny oraz zaburzoną odpowiedź immunologiczną. Lepsze zrozumienie tych powiązanych procesów może stanowić podstawę do opracowania nowych terapii i metod leczenia chorób neurodegeneracyjnych.

Ederavone jest lekiem neuroprotektynym, którego główne działanie polega na zmiataniu wolnych rodników i zmniejszeniu stresu oksydacyjnego. Jednak skuteczność jego działania jest w dalszym ciągu niewystarczająca, ze względu na ograniczenia chemiczne, takie jak słaba rozpuszczalność lub stabilność oraz ograniczenia farmakologiczne prowadzące do eliminacji leku, toksyczność obwodową oraz liczne skutki uboczne. Wydaje się, że proces enkapsulacji jest obiecującą strategią przezwyciężenia tych ograniczeń i zwiększenia skuteczności terapeutycznej leków neuroprotektynnych.

Celem pracy było porównanie neuroprotektynnego działania wolnego ederavonu i ederavonu zamkniętego w nanokapsułkach w hodowlach organotypowych hipokampa w warunkach deprywacji glukozy i tlenu – uznanego *ex vivo* modelu udaru niedokrwiennego mózgu.

Wykazaliśmy wpływ deprywacji glukozy i tlenu na poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10) oraz czynnika indukowanego hipoksją 1 alfa (ang. hypoxia-inducible factor 1 α HIF-1 α). Zbadaliśmy wpływ wolnego ederavonu i ederavonu zamkniętego w nanokapsułkach na cytotoksyczność i uwalnianie tlenu azotu, a także na zmiany w liczebności populacji mikrogleju i astrocytów w odpowiedzi na eksperymentalną ischamię.

Uzyskane dane wskazują, że nanocząsteczki mogą być skutecznymi nanonośnikami leków o potencjale protektynym dla komórek ośrodkowego układu nerwowego. Modulacyjne właściwości ederavonu zdają się wskazywać, że związek ten może być rozważony w opracowywaniu nowoczesnych teranostycznych terapii neuroprotektynnych opartych na modulacji stresu oksydacyjnego i nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu odpornościowego.

Wsparcie finansowe - projekt 2019/34/H/ST5/00578 z Narodowego Centrum Nauki oraz
Działalność Statutowa Zakładu Neuroendokrynologii Doświadczalnej IF im. Jerzego Maja
PAN

Ocena wpływu ACEA 1025 w zwierzęcym modelu neurotoksyczności wywołanej deksametazonem

Zofia Danilczuk¹, Beata Krasuska-Grzegorzczuk², Halina Szymczyk¹

¹) Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej I Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²) Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Glikokortykosteroidy (GCs), hormony steroidowe syntetyzowane przez korę nadnerczy, wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwalergiczne i immunosupresyjne, dzięki którym znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Podwyższony poziom glikokortykosteroidów (np. stres, terapia glikokortykosteroidami) może powodować uszkodzenie mózgu, a w szczególności hipokampa – struktury bogatej w receptory glikokortykosteroidowe, a odpowiadającej za pamięć, odczuwanie emocji, regulację nastroju i zachowanie. Podkreślana jest rola hamującego wpływu GCs na transport glukozy do hipokampalnych neuronów i gleju czy też udział GCs w zwiększonej transmisji glutaminianergicznej. Poprzez aktywację receptorów NMDA, AMPA i metabotropowych kwas glutaminowy może brać udział w ostrym uszkodzeniu mózgu oraz wpływać na proces neurodegeneracji. W związku z tym ważnym jest poszukiwanie substancji o właściwościach neuroprotektoryjnych, które wykazywałyby działanie ochronne wobec uszkadzającego neurony OUN działania glikokortykosteroidów i warunkowały bezpieczną terapię glikokortykosteroidową. Odkrycie ekscytotoksyczności glutaminianu skłoniło do poszukiwań substancji neuroprotektoryjnych wśród antagonistów aminokwasów pobudzających.

Celem badań jest ocena wpływu ACEA 1021 (5-nitro-6,7-dichloro-1,4-dihydro-2,3-quinoxalinedione; licostinel), selektywnego antagonisty miejsca glicynowego związanego z kompleksem receptora NMDA, na neurotoksyczność wywołaną deksametazonem u myszy. Do badań wykorzystano opracowany w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, model neurotoksyczności glikokortykosteroidowej, polegający na podawaniu dootrzewnowo myszom deksametazonu (DEX-syntetyczny agonista GCs) w dawce 16 mg/kg/dobę przez 14 dni. ACEA 1021 w dawkach: 1,25, 2,5 i 5 mg/kg/dobę podawano 30 min przed DEX. Nasze wcześniejsze badania behawioralne wykazały efekt protekcyjny zastosowanego ACEA 1021 w modelu neurotoksyczności glikokortykosteroidowej wywołanej deksametazonem. Dla potwierdzenia tego działania, dodatkowo wykonano oznaczenia morfologiczne oraz immunohistochemiczne na białka PCNA i GFAP w polu CA3 hipokampa. 48 h po ostatniej dawce stosowanych leków myszy zostały poddane znieczuleniu w narkozie pentobarbituranowej (Nembutal 180 mg/kg), dekapitowane a pobrane mózgi perfundowane 0,9% NaCl z heparyną i 4% formaldehydem (pH 7,4). W badaniach histomorfologicznych, zabarwione hematoksyliną i eozyną (H+E) skrawki parafinowe mózgów oceniano w mikroskopie świetlnym. Zastosowano również ocenę morfometryczną wykorzystując program Fiji.app. Komórki z jasnym, okrągłym jądrem i widocznym jąderkiem były uważane za prawidłowe, podczas gdy neurony z ciemnym ciałem komórki za uszkodzone. W komórkach warstwy piramidowej pola CA3 hipokampa oceniano również odczyn immunohistochemiczny na PCNA (Proliferating Cell Nuclear Factor- jądrowy antygen dzielącej się komórki jako marker proliferacji komórkowej i wykładnik nasilenia

procesów proliferacji komórki) oraz przeprowadzono ocenę immunohistochemiczną przy użyciu GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). GFAP jest białkiem filamentów pośrednich występującym w komórkach glejowych, m.in. w astrocytach regulujących aktywność neuronów, którego zwiększona immunoreaktywność jest przyjmowana jako wskaźnik glejowy lub uszkodzenia neuronów.

Wyniki badań wykazały, że deksametazon zastosowany w dawce 16 mg/kg/dobę przez 14 dni powodował uszkodzenie neuronów pola CA3 hipokampa pod postacią obrzęku pozakomórkowego, wakuolizacji oraz zwyrodnienia jąder. Dodatkowo zmniejszał aktywność proliferacyjną w polu CA3 hipokampa ocenianą przy pomocy odczynu immunohistochemicznego na PCNA oraz zmniejszał średnią intensywność reakcji immunohistochemicznej na GFAP w tym regionie. ACEA 1021 w żadnej ze stosowanych dawek nie powodował istotnego nasilenia zmian morfologicznych neuronów pola CA3 hipokampa. Obserwowano istotne zmniejszenie ilości uszkodzonych komórek piramidowych oraz normalizowanie obniżonej intensywności reakcji immunochemicznej GFAP w polu CA3 hipokampa po wszystkich zastosowanych dawkach ACEA 1021 w modelu neurotoksyczności z deksametazonem, a największą aktywność proliferacyjną obserwowano po zastosowaniu niższych dawek tego antagonisty NMDA.

Na podstawie uzyskanych wyników, można wnioskować, że ACEA 1021 wykazuje, w zależności od dawki, działanie protekcyjne w zwierzęcym modelu neurotoksyczności wywołanej deksametazonem. Biorąc pod uwagę nasze wcześniejsze i kontynuowane badania behawioralne oraz aktualne morfologiczne i immunochemiczne, niższe dawki ACEA 1021 tj. 1.25 i 2.5 mg/kg wykazują większy potencjał protekcyjny w modelu neurotoksyczności glikokortykosteroidowej. Badania z zastosowaniem antagonisty miejsca glicynowego receptora NMDA potwierdzają udział aminokwasów pobudzających w neurotoksyczności glikokortykosteroidów a zastosowany model z użyciem deksametazonu okazał się przydatny w przeprowadzeniu tych badań. A zatem, rozważając prowadzenie bezpiecznej terapii glikokortykosteroidami można sugerować, że ACEA 1021, jako potencjalny lek protekcyjny, mógłby spełniać taką funkcję, jednakże konieczne jest prowadzenie dalszych obserwacji i badań.

miR-1a-3p modulatorem podatności i odporności na stres

Joanna Solich, Agata Faron-Górecka, Paulina Pabian, Katarzyna Latocha, Marta Dziedzicka-Wasylewska

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Stres jest reakcją organizmu w odpowiedzi na zewnętrzne lub wewnętrzne bodźce, które zakłócają jego równowagę i za pomocą której organizm reaguje na zagrożenie. Przedłużający się stres jest przyczyną wielu chorób m.in. depresji czy zespołu stresu pourazowego, ale także cukrzycy i chorób układu krążenia. Jednak nie wszystkie organizmy reagują w ten sam sposób w odpowiedzi na stres, dzięki temu wyróżnia się osobniki podatne i odporne na stres. Niektóre aspekty odporności na stres mogą być modelowane i badane na zwierzętach co wiąże się z przeprowadzeniem odpowiednich testów behawioralnych. Istnieją również szczepy zwierząt, które wykazują odporność na stres. Takim szczepem są myszy SWR/J oraz myszy pozbawione funkcjonalnego transportera noradrenergicznego (NET-KO). Z kolei myszy C57BL/6J (WT) wykazują podczas badań podatność na stres.

Dlatego istotne jest odnalezienie biomarkerów różnicujących myszy podatne od odpornych na stres, które mogłyby stać się ewentualnymi celami farmakologicznymi, pozwalającymi lepiej zarządzać stresem i zapobiegać występowaniu chorób z nim związanych.

Niniejsze badania miały na celu poszukiwanie takich biomarkerów wśród miRNA. W tym celu badano surowicę myszy WT, NET-KO i SWR/J zarówno kontrolnych, jak też poddanych stresowi unieruchomienia. Do tych eksperymentów wykorzystano Custom TaqMan Array MicroRNA Cards (Thermo Fisher Scientific). Również sprawdzono ekspresję wielu miRNA w różnych rejonach mózgu. Najbardziej interesujący okazał się mmu-miR-1a-3p, który różnicował myszy podatne od odpornych na stres zarówno w surowicy jak i w mózgu. Aby sprawdzić jego wpływ na zachowanie zwierząt przeprowadzono infuzję preparatu MIRACLE mmu-miR-1a-3p Antagomir (ANT-miR-1a-3p)- zmniejszającego ekspresję miR-1a-3p - do komory mózgu myszy WT oraz MIRACLE mmu-miR-1a-3p Agomir (AGO-miR-1a-3p) – zwiększającego ekspresję miR-1a-3p - do mózgu myszy NET-KO, a następnie przeprowadzono test wymuszonego pływania. W ten sposób zaobserwowano zmianę zachowania zwierząt podatnych na stres (WT) na takie jakie obserwowaliśmy u odpornych na stres i odwrotnie – myszy odporne na stres (NET-KO) zmieniły swoje zachowanie na takie, jakie wykazywały myszy WT. Tydzień po wykonanym teście behawioralnym sprawdzono ekspresję mmu-miR-1a-3p w surowicy myszy WT i wykazano, że ekspresja ta obniżała się po podaniu ANT-miR-1a-3p i nie zmieniała się pod wpływem stresu, co było spójne ze zmianami stwierdzonymi w surowicy myszy odpornych na stres przed infuzją AGO-miR-1a-3p.

Wydaje się, że mmu-miR-1a-3p jest dobrym kandydatem zarówno jako biomarker związany z odpornością na stres, jak też ewentualny cel terapeutyczny, zwłaszcza że jest on również związany z dysfunkcjami mięśnia sercowego i regulacją metabolizmu glukozy.

Badania te były wspierane przez Narodowe Centrum Nauki (projekt nr 2016/23/B/NZ4/01086) i działalność statutową Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Modyfikacja sjałilacji błony komórkowej gļejaka jako mechanizm modulujący wrażliwość komórek na inhibitory EGFR.

Patrycja Jastrząb¹, Robert Czarnomysy², Halina Car¹, Przemysław Wielgat¹

¹) Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²) Zakład Syntezy i Technologii Środków Lecznicych; Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Nieprawidłowa glikozylacja stanowi charakterystyczną cechę komórek nowotworowych. Zmiany ilościowe i jakościowe struktury łańcuchów cukrowych, mogą przyczynić się do rozwoju nowotworu. Szczególną modyfikacją potranslacyjną związaną z glikozylacją białek jest sjałilacja – proces polegający na dodawaniu reszt kwasu sjałowego do terminalnych części łańcuchów cukrowych. Sjałilacja odgrywa kluczową rolę w progresji nowotworów, a zmiany we wzorze sjałilacji zostały opisane jako czynniki modyfikujące skuteczność chemioterapii. Celem badania była ocena wpływu zmian sjałilacji błony komórkowej na wrażliwość komórek nowotworowych na inhibitory EGFR. Ma to istotne znaczenie w terapii nowotworów gļeju, gdzie skuteczność leczenia jest ograniczona.

Linie komórkowe gļejaka wielopostaciowego LN-18 i LN-229 różniące się poziomem ekspresji receptorów EGFR i HER2 oraz wrażliwością na temozolomid zostały poddane działaniu erlotynibu. Modyfikację sjałilacji błony komórkowej przeprowadzono poprzez enzymatyczne usunięcie kwasu sjałowego z N-końców glikoprotein i glikosacharydów za pomocą sjałidazy. Wrażliwość komórek na erlotynib oceniono przeprowadzając analizy cyklu komórkowego i poziomu ekspresji białka Ki-67. Aktywność migracyjną komórek zbadano w teście gojenia rany "wound healing". Zmiany we wzorze sjałilacji potwierdzono cytometrycznie za pomocą znakowania sjałoglikanów lektyną SNA.

Enzymatyczne usunięcie kwasu sjałowego w komórkach LN18 zwiększało antyproliferacyjne działanie erlotynibu wyrażone zmniejszeniem ekspresji białka Ki-67 i zmianą podziału faz cyklu komórkowego G1, G2 i S.

W linii komórkowej LN18 zaobserwowano istotny wpływ erlotynibu na migrację, w przeciwieństwie do komórek linii LN229. Enzymatyczne usunięcie kwasu sjałowego w komórkach LN229 zmniejszało migrację komórek po narażeniu na erlotynib. Podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku komórek LN18. Uzyskane wyniki sugerują, że modyfikacja sjałilacji błony komórkowej może być istotnym mechanizmem warunkującym wrażliwość komórek gļejaka na leki z grupy inhibitorów receptora EGFR.

Fosforylacja p53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (A549); wpływ cisplatyny i pyłów zawieszonych

Adam Hołownia, Katarzyna Milewska, Agata Niechoda

Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Zanieczyszczenie powietrza generuje uszkodzenia DNA komórek układu oddechowego, a narażenie chroniczne współwystępuje z rakiem płuc. Białko p53 jest „stażnikiem genomu” i jest aktywowane przez fosforylację we wczesnych stadiach uszkodzenia DNA. Celem naszych badań była ocena wpływu standaryzowanych zanieczyszczeń powietrza: sadzy technicznej (CB), pyłu miejskiego (UD) i sadzy nanocząsteczkowej (NPCB) na cykl komórkowy, uszkodzenia DNA i fosforylację białka p53 w pozycjach Ser 9, Ser 20, Ser 46 i Ser 392 w proliferujących i nieproliferujących komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (A549) oraz w komórkach z lekoopornością na cisplatynę (CisPT). Fosforylowane p53 oznaczono ilościowo w subpopulacjach komórek za pomocą cytometrii przepływowej, stosując specyficzne przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromami i analizę dwuwymiarowych wykresów rozrzutu rozkładu fluorescencji. CisPT, UD i NPCB zwiększyły lokalnie-specyficzną fosforylację p53, tworząc charakterystyczne wzorce. NPCB aktywowało wszystkie miejsca niezależnie od cyklu komórkowego, podczas gdy UD był bardziej selektywny. p53 Ser 9-P i p53 Ser 20-P korelowały dodatnio z liczbą komórek traktowanych CisPT w fazie G0/G1, a NPCB i NPCB + CisPT dawały podobny efekt. Stwierdzono także obecność dodatniej korelacji i zintegrowaną odpowiedź pomiędzy Ser 20-P i Ser 392-P w spoczynkowych komórkach A549 traktowanych NPCB i CisPT, ale nie UD. Współzależność między ekspresją p53 fosforylowanego w Ser 20 i Ser 392 a zatrzymaniem cyklu komórkowego pokazuje, że zmiany potranslacyjne mogą być związane z aktywacją funkcjonalną. Nasze dane sugerują, że fosforylacja białka p53 w odpowiedzi na specyficzne uszkodzenia DNA jest wielowarstwowa, częściowo zintegrowana i prowadzi do funkcjonalnej aktywacji, krytycznej w profilaktyce i leczeniu raka płuca.

Wpływ niedoboru cynku i przewlekłego stresu unieruchomienia na homeostazę cynku i miedzi, ekspresję metalotionein oraz status stresu oksydacyjnego w wątrobie.

Dorota Bederska-Łojewska¹, Justyna Turek¹, Agata Machaczka¹, Łukasz Gąsior¹, Bartłomiej Pochwat¹, Bartłomiej Rospond², Joanna Piotrowska², Bernadeta Szewczyk¹

¹Zakład Neurobiologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Majkowskiego Polskiej Akademii Nauk

² Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Wstęp

Wcześniejsze badania wykazały, że dieta uboga w cynk i przewlekły stres indukują zachowania depresyjne odporne na leczenie u gryzoni oraz zmiany morfologiczne w różnych narządach (śledziona, grasicca, wątroba, jelita). Wątroba jest głównym narządem odpowiedzialnym za metabolizm cynku. Sam niedobór cynku może zakłócać funkcje hepatocytów. Celem badania było zbadanie potencjalnego wpływu stresu i niedoboru cynku na zmiany stężeń cynku i miedzi, a także zmiany w ekspresji metalotionein (białek biorących udział w wiązaniu metali). Ocenialiśmy również status oksydacyjny myszy poddanych procedurom stresowym i niedoborowi cynku.

Materiał i metody

Myszy C57Bl/6 zostały podzielone na cztery grupy: 1. ZnA - zwierzęta kontrolne z paszą zawierającą 50 mg/kg cynku; 2. ZnACRS - zwierzęta poddane 3-tygodniowemu przewlekłemu stresowi unieruchomienia (3 godziny dziennie), otrzymując tę samą dietę jak w poprzednia grupa; 3. ZnD - otrzymujące dietę z poziomem cynku < 3 mg/kg przez 4 tygodnie; 4. ZnDCRS - poddane tej samej procedurze stresowej co ZnACRS, ale z dietą ubogą w cynk. Ocena stężeń MT-1, MT-2, MT-3, ZnT-1, TBARS, SOD i GSH-Px w wątrobie (prawy płąt środkowy) została przeprowadzona za pomocą zestawu testów immunoenzymatycznych (ELISA) firmy Enlilbio Biotech Co., Ltd. (Wuhan, Chiny). Całkowitą zawartość Zn i Cu określono metodą spektroskopii absorpcji atomowej (AAS).

Results

Stężenie MT-2 i MT-3 było najwyższe w grupie ZnD (MT-2: 2124±122 ng/μg białka, MT-3: 1265±57.59 ng/μg białka) w porównaniu do grup ZnA (MT-2: 1663±58.90 ng/μg białka, MT-3: 896±18.50 ng/μg białka), ZnACRS (MT-2: 1443±157.8 ng/μg białka, MT-3: 1012±64.39 ng/μg białka) i ZnDCRS (MT-2: 1591±104.5 ng/μg białka, MT-3: 1041±59.45 ng/μg białka). Ograniczenie cynku w diecie, zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu ze stresem, znacząco zwiększyło MT-1 w obu grupach: ZnD (1418±75.34 ng/μg białka), ZnDCRS (1275±80.89 ng/μg białka) w porównaniu do grupy kontrolnej (899±42.15 ng/μg białka). Grupy ZnA (898.6±22.38 ng/μg białka) i ZnACRS (915.0±57.93 ng/μg białka) miały niższą ekspresję białka ZnT-1 w wątrobie niż ZnD (1190±61.27 ng/μg białka).

Stres oksydacyjny mierzony pośrednio przez poziom TBARS był najwyższy w grupie ZnA (57281±11913 μmol/g tkanki) w porównaniu do pozostałych grup (ZnD 19417±8813; ZnACRS 25433±12372, ZnDCRS±36350 μmol/g tkanki). Znacząco obniżony poziom TBARS zaobserwowano u myszy ZnD w porównaniu do ZnDCRS. Najwyższą aktywność SOD zaobserwowano w grupie ZnA (0,862±0,24 U/mg białka) w porównaniu do grupy ZnD (0,613±0,15 U/mg białka). Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności GSH-Px (ZnA 42,95±18,32 U/mg białka, ZnD 34,06±16,22 U/mg białka, ZnACRS 38,54±9,51 U/mg białka, ZnDCRS 43,75±7,06 U/mg białka). Stężenie cynku nie różniło się między wszystkimi grupami, ale grupa ZnDCRS miała niższe stężenie Cu (2,29±0,42) w porównaniu do grupy kontrolnej (2,87±0,47).

Wnioski

Na podstawie wyników można stwierdzić, że niedobór cynku i przewlekły stres unieruchomienia wpływają na ekspresję metalotionein, markery stresu oksydacyjnego oraz homeostazę cynku i miedzi w wątrobie. Niedobór cynku znacząco zwiększa poziomy metalotionein i wpływa na markery stresu oksydacyjnego, podczas gdy przewlekły stres unieruchomienia modyfikuje te efekty. Połączenie niedoboru cynku i stresu zmienia odpowiedź na stres oksydacyjny oraz stężenie miedzi. Wyniki te podkreślają złożoną interakcję między stanem cynku, stresem a homeostazą metali w wątrobie.

Badania były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki (projekt nr. 2020/37/B/NZ5/03891).

Czy diapauza zarodkowa może odmłodzić zarodki? Wpływ diapauzy na ekspresję genów w blastocystach pochodzących od matek w zaawansowanym wieku

Łukasz Gąsior^{1,3}, Richard Musson², Hafsa Gulzar², Grażyna Ewa Ptak³

¹⁾ Instytut Farmakologii im. Jerzego Majkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Zakład Neurobiologii,

²⁾ Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska; Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.

³⁾ Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Tło: Zaawansowany wiek matki (AMA) niesie ze sobą znaczne ryzyko niekorzystnych wyników ciążowych oraz długoterminowych problemów zdrowotnych u potomstwa. Do tych ryzyk należą zwiększone wskaźniki poronień, wrodzonych wad rozwojowych, niskiej masy urodzeniowej, przedwczesnego porodu oraz zaburzeń neurodewelopacyjnych, takich jak autyzm, padaczka i lęk. Chociaż niekorzystne skutki AMA na potomstwo były szeroko badane, dokładne mechanizmy pozostają niejasne. W szczególności zmiany w ekspresji genów w zarodkach przedimplantacyjnych spowodowane AMA mogą leżeć u podstaw wielu z tych ryzyk.

Diapauza zarodkowa jest naturalną strategią reprodukcyjną u niektórych ssaków, gdzie rozwój zarodka zostaje tymczasowo wstrzymany z powodu niereceptywnego stanu macicy matki. To zawieszenie pozwala na synchronizację z optymalnymi warunkami środowiskowymi. Podczas diapauzy aktywność komórkowa i metabolizm są znacząco redukowane, a ochronne mechanizmy, takie jak zwiększona naprawa DNA i zmniejszony stres oksydacyjny, są aktywowane. Te ochronne ścieżki są kluczowe dla utrzymania żywotności zarodka w warunkach, które zazwyczaj byłyby niekorzystne dla rozwoju, takich jak stres oksydacyjny czy uszkodzenia DNA.

Cel: Biorąc pod uwagę te mechanizmy ochronne, diapauza zarodkowa stanowi intrygującą potencjalną interwencję mającą na celu poprawę jakości zarodków dotkniętych AMA. Wprowadzenie diapauzy może umożliwić naprawę uszkodzeń genetycznych i zmniejszenie stresu oksydacyjnego, który zazwyczaj wzrasta wraz z wiekiem matki. Celem tego badania jest zbadanie, czy diapauza może złagodzić negatywne skutki AMA na profil ekspresji genów w zarodkach przedimplantacyjnych, potencjalnie oferując przełomowe strategie terapeutyczne.

Metody: Badanie obejmowało młode (3-miesięczne) i stare (10-12-miesięczne) myszy. Superowulację indukowano za pomocą 10U PMSG i 10U hCG. Stare myszy poddano diapauzie zarodkowej poprzez owaryektomię w 2,5 dniu po kopulacji, a zarodki pobierano w 12 dniu po kopulacji. Analizowano cztery grupy: Młode, AMA, Młode + ED i AMA + ED. RNA izolowano z poszczególnych zarodków za pomocą zestawu Dynabeads™ mRNA Purification Kit. Biblioteki przygotowywano za pomocą zestawu SMART-Seq v4 i sekwencjonowano na sekwencjonatorze NovaSeq. Ekspresję genów analizowano za pomocą pseudoalignmentu z wykorzystaniem Kallisto, w porównaniu do transkryptomu myszy GRCm39. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą DESeq2. Analizę wzbogacenia przeprowadzono z użyciem platformy Metascape. Za statystycznie istotne uznawano geny z log2FoldChange większym niż 2 lub mniejszym niż -2 oraz FDR mniejszym niż 0,05 (skorygowanym za pomocą korekcji Bonferroniego). W grupie zaawansowany wiek plus diapauza w porównaniu do grupy kontrolnej zidentyfikowano 2800 statystycznie istotnych transkryptów, podczas gdy w grupie zaawansowany wiek w porównaniu do młodej grupy zidentyfikowano 259 istotnych transkryptów.

Wyniki: Znacząca nadekspresja ścieżek związanych z sygnalizacją synaptyczną, zachowaniem i rozwojem układu nerwowego została zaobserwowana w zarodkach od starych myszy w

porównaniu do młodych myszy. Zarodki od myszy poddanych diapauzie wykazywały profile ekspresji genów podobne do zarodków od młodych myszy, z znaczącym wzbogaceniem procesów cyklu komórkowego i ścieżek metabolicznych. Diapauza wiąże się ze zmniejszonym stresem oksydacyjnym i zwiększonymi mechanizmami naprawy DNA, co prawdopodobnie przyczynia się do obserwowanej normalizacji profilu ekspresji genów. Sugeruje to potencjalną rolę diapauzy w poprawie jakości zarodków poprzez minimalizowanie stresu rozwojowego i korygowanie aberracji genetycznych.

Wnioski: AMA zmienia ekspresję genów w zarodkach przedimplantacyjnych, szczególnie wpływając na ścieżki rozwoju neuronalnego. Diapauza zarodkowa częściowo przywraca profil ekspresji genów podobny do tego u młodych myszy, co sugeruje potencjalne strategie terapeutyczne mające na celu złagodzenie ryzyka związanego z AMA poprzez poprawę jakości zarodków dzięki mechanizmom ochronnym aktywowanym podczas diapauzy.

Podziękowania: Badania te były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce w ramach grantów 2019/35/N/NZ3/03213, 2019/35/B/NZ4/03547 oraz 2021/41/B/NZ3/03507.

Wpływ zmiany poziomu serotoniny w mózgu na pamięć wzrokową zwierząt w teście rozpoznawania nowego obiektu (NOR)

Gołębiowska Joanna¹, Judith Homberg², Natalia Alenina³, Michael Bader³, Popik Piotr¹, Agnieszka Nikiforuk¹

¹) Zakład Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii PAN im. Jerzego Maja w Krakowie

²) Department of Cognitive Neuroscience, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, the Netherlands

³) Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin

Układ serotonergiczny odgrywa bardzo ważną rolę w wielu procesach zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym. Synteza serotoniny w mózgu przebiega przy udziale enzymu hydroksylazy tryptofanu (TPH2), który jest niezbędny do tego procesu. Natomiast transporter wychwytu zwrotnego serotoniny (SERT) odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności serotonergicznej.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie procesów pamięci wzrokowej u szczurów z genetycznymi modyfikacjami w obrębie genów kodujących TPH2 oraz SERT. Szczury TPH2-KO zostały wygenerowane przy zastosowaniu nukleazy z motywem palca cynkowego (Zincfinger nuclease). Enzym ten powoduje wycięcie 11 nukleotydów w obrębie siódmego eksonu szczurzego genu Tph2. Powstała mutacja typu „przesunięcie ramki odczytu” prowadzi do powstania przedwczesnego kodonu stop, co skutkuje нефunkcyjnym produktem białkowym, czyli zmniejszeniem poziomu serotoniny w mózgu. Szczury SERT-KO zostały wygenerowane w oparciu chemiczną mutagenezę z zastosowaniem N-etylo-N-nitrozomocznik (ENU). Związek ten powoduje powstanie punktowej mutacji, tj. transwersji cytozyny do adeniny w pozycji 3924 genu SERT. Zmiana ta prowadzi do powstania przedwczesnego kodonu stop w obrębie trzeciego eksonu kodującego drugą wewnątrzkomórkową pętlę białka SERT. Powstaje krótszy i нефunkcyjny produkt białkowy, czyli szczury te charakteryzują się zwiększonym poziomem serotoniny w mózgu.

Do oceny wzrokowej pamięci epizodycznej użyto testu rozpoznawania nowego obiektu NOR (Novel Object Recognition Test), polegającego na ocenie spontanicznej eksploracji dwóch obiektów przez szczura. Test dzieli się na dwie 3-minutowe próby oddzielone przerwą (ITI) o różnej długości, w zależności od wariantu testu (1 lub 6 godzin przerwy). Podczas pierwszej próby (T1) dwa identyczne obiekty (A1 i A2) umieszczone zostają w przeciwległych rogach otwartego pola. W drugiej próbie (T2) jeden z obiektów zostaje zastąpiony nowym (A=znajomy, B=nowy). Na podstawie czasu eksploracji (E) obu obiektów obliczany jest wskaźnik dyskryminacji według wzoru: $DI = (EB - EA) / (EA + EB)$.

Wykazano, że szczury ze zwiększonym poziomem serotoniny w mózgu (SERT-KO) wykazują zaburzenia pamięci wzrokowej po upływie sześciu godzin. U zwierząt TPH2-KO nie wykazano żadnych istotnych zmian ani w jedno- ani w sześć- godzinnym wariancie testu NOR.

Niniejsza praca ukazuje, że zmiany w obrębie układu serotonergicznego prowadzące do zwiększenia poziomu serotoniny w mózgu mogą prowadzić do zaburzeń pamięci wzrokowej. Uzyskane wyniki potwierdzają, że szczury pozbawione transportera serotoninowego stanowią cenny model służący do badania konsekwencji wzrostu poziomu serotoniny w mózgu.

Badania były finansowane z grantu ERA-NET Neuron II JTC 2015 oraz z działalności statutowej Zakładu Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii PAN im. Jerzego Maja w Krakowie

Prenatalne podanie deksametazonu prowadzi do obniżenia ekspresji genów kodujących białka rybosomalne w korze czołowej

Katarzyna Głombik¹, Magdalena Kukla-Bartoszek¹, Małgorzata Borczyk², Jacek Hajto², Marcin Piechota², Michał Korostyński², Agnieszka Basta-Kaim¹

¹) Pracownia Immunoendokrynologii, Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk

²) Pracownia Farmakogenomiki, Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk

Pomimo wieloletnich badań nad możliwościami terapii depresji, odsetek pacjentów cierpiących na to zaburzenie, u których standardowe leczenie jest nieefektywne, stale rośnie. Z tej przyczyny lepsze zrozumienie etiologii tej choroby jest konieczne do opracowania nowych, spersonalizowanych strategii leczenia. Jedną z najnowszych hipotez wiąże deregulację ekspresji genów kodujących białka rybosomalne (RPG, ang. ribosomal protein genes) oraz zmiany w liczbie i składzie rybosomów jako jedną z przyczyn rozwoju depresji. Zmiany te, zwłaszcza w neurytach, mogą modyfikować syntezę białek zaangażowanych w proces przekazywania synaptycznego, co może prowadzić do jego upośledzenia. W związku z powyższym, naszym celem była analiza zmian ekspresji RPG w zwierzęcym modelu depresji opartym o prenatalne podawanie deksametazonu, w korze czołowej jako strukturze zaangażowanej w patofizjologię depresji. Ciężarnym samicom szczurów szczepu Sprague-Dawley podawano syntetyczny glikokortykoid - deksametazon (w dawce 0.1 mg/kg) począwszy od 14 dnia ciąży aż do porodu. Dorosłe, męskie potomstwo matek kontrolnych i matek, którym podawano deksametazon uśmiercono i wyizolowano korę czołową w celu analizy przy użyciu metody sekwencjonowania RNA. Analizę różnicowej ekspresji genów przeprowadzono za pomocą pakietu R: EdgeR v3.42.4. Wartości p skorygowano dla wielokrotnego testowania przy użyciu poprawki Benjaminiego-Hochberga ($FDR < 0.05$). Do analizy funkcjonalnej wykorzystano bazę danych KEGG i przeprowadzono ją przy użyciu ClueGO v.2.5.6 i GeneMania v.3.5.2., wtyczek do oprogramowania Cytoscape v.3.8.2 wraz z narzędziem PINE, które wykorzystano do wizualizacji wyników. Analiza wzbogacenia pokazała, że podanie deksametazonu w okresie prenatalnym spowodowało znaczny spadek poziomu ekspresji 15 RPG, kodujących białka dużej i małej podjednostki rybosomalnej (Rpl: Rpl13, Rpl18a, Rpl32, Rpl35, Rpl35a1, Rpl37, Rpl37a, Rpl8, Rplp2; Rps: Rps101, Rps15, Rps16, Rps18, Rps21, Rps28). Wydaje się, że obniżenie poziomu RPG w mózgu może skutkować zmniejszoną biosyntezą rybosomów w neuronach, co prowadzi do globalnego spadku translacji i syntezy białek. Co więcej, ponieważ rybosomy biorą udział w syntezie receptorów dla neuroprzekaźników, białek rusztowania synaptycznego i innych czynników regulacyjnych, zaobserwowane zmiany mogą pośrednio zmieniać proces neuroprzekazywania, ale aby to ocenić konieczne są dalsze szczegółowe badania.

Finansowanie: Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2020/39/D/NZ7/01610 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

Cardiovascular effects in SARS - CoV – 2 infected humans.

Andrzej J. Plech¹, Monika Rykaczewska - Czerwińska², Dominika Czewińska - Głowska²

¹) Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny

²) Instytut Nauk Medycznych, Uniwersytet Opolski

SARS-CoV-2 induced infection of respiratory system in of several patients may be of different intensity. It may be manifested as a mild clinical status till a serious clinical manifestations as a pneumonia, or an acute respiratory distress syndrome (ARDS). Further clinical studies of patients SARS-CoV infected appeared a broad spectrum of the dysfunction of different internal organs, including cardiovascular system. Among them the lesion of cardiac muscle and the cardiac arrhythmias were evidently more frequent in SARS - CoV – 2 infected patients. Endothelial dysfunction is an important risk factor for patients with COVID-19 and with different cardiological disturbances.

Mental and neurological effects in SARS - CoV – 2 infected patients.

Andrzej J. Plech¹, Monika Rykaczewska - Czerwińska², Dominika Czewińska - Głowska²

¹) Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny

²) Instytut Nauk Medycznych, Uniwersytet Opolski

Coronaviridae exert a strong biological effect on different living species: invertebrates as well on humans. A new virus belonging to this family: SARS CoV – 2 may often induce in humans a disease COVID – 19, which since 2019 is regarded as a pandemic infectious disease. It was proved that these viruses may penetrate via lungs inside of infected organism. Puybasset presented hypothesis of existing a functional axis: brain - lungs - brain in SARS – CoV – 2 infected patients. It is necessary to confirm this hypothesis. However the results of in vitro study on human astrocytes, and on human microglial cells showed that they are sensitive to SARS – CoV – 2 viruses penetrating into human brain.

These results support an important but transient influence of SARS - Cov – 2 on human central nervous system.

Myszy ze zróżnicowanym tempem metabolizmu (BMR) jako doskonały model badania rozwoju chorób cywilizacyjnych

Halina Car¹, Diana Sawicka¹, Sebastian Maciak², Anna Sadowska², Marek Konarzewski²

¹) Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²) Katedra Ekologii Ewolucyjnej i Fizjologicznej, Uniwersytetu w Białymstoku

Myszy laboratoryjne selekcjonowane na wysokie i niskie tempo metabolizmu podstawowego (BMR) (hodowla w Katedrze Ekologii Ewolucyjnej i Fizjologicznej na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku) stanowią unikatowy model do badania rozwoju chorób cywilizacyjnych zależnych od metabolizmu.

U myszy szczepu *Mus musculus* oprócz różnic w wartościach BMR obserwowane są wielokierunkowe zmiany architektury komórkowej. U myszy charakteryzujących się niskim wskaźnikiem metabolizmu podstawowego (LBMR), komórki pochodzące z narządów układu pokarmowego (hepatocyty, enterocyty) i komórki kanalików nerkowych są mniejsze, podczas gdy erytrocyty oraz komórki nabłonka skóry są znacznie większe w porównaniu do tych samych komórek u myszy z wysokim metabolizmem podstawowym (HBMR). Zwierzęta te różnią się istotnie zdolnością do odpowiedzi immunologicznej, podatnością na zatrucia substancjami szkodliwymi, co przekłada się na tempo starzenia się komórek, oraz rozwój takich chorób jak cukrzyca czy nowotwory. Obie linie myszy charakteryzują się zróżnicowaną generacją reaktywnych form tlenu (RFT), proporcją nienasyconych kwasów tłuszczowych i zdolnością do utrzymania mechanizmów obronnych. Badania z zastosowaniem tego modelu pozwalają na kontrolowanie wpływ zmienności BMR na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy i nowotworów.

W ramach współpracy i przeprowadzonych badań wykazaliśmy, iż myszy linii HBMR charakteryzują się wyższą ekspresją genu mTOR w hepatocytach niż myszy linii LBMR, co może sugerować wzmocniony mechanizm obrotu glukozy w organizmach z wyższym BMR, a tym samym spowolnienie rozwoju insulinooporności (IR) i cukrzycy typu 2 (T2D). Ponadto, stwierdziliśmy u myszy linii HBMR silniejszą relaksację aorty w wyniku większej gęstości kanałów potasowych w śródbłonku naczyń krwionośnych, co potencjalnie może stanowić mechanizm ochronny przed nadciśnieniem. Nasze ostatnie badania pokazały istotnie wyższe stężenia enzymów oksydacyjnych oraz wyższą ekspresję genu Keap-1 w wątrobie i mózgu oraz szybszy rozwój i silniejszy wzrost guza nowotworu jelita grubego u myszy linii HBMR.

Zainteresowanie tematyką wpływu tempa metabolizmu w rozwoju innowacyjnych metod zapobiegania i/lub leczenia chorób cywilizacyjnych ostatnio istotnie wzrosło. Nasze dotychczasowe badania z zastosowaniem wyżej opisanego modelu zwierząt mają charakter unikatowy oraz pośrednio odnoszą się do poznania czynników sprzyjających minimalizacji ryzyka rozwoju chorób zależnych od metabolizmu, a także zmniejszenia prawdopodobieństwa zachorowania zwłaszcza wśród osób z grupy ryzyka.

Rozwój badań behawioralnych: analiza interakcji społecznych szczurów oparta na uczeniu maszynowym

Ewelina Cyrano, Agnieszka Potasiewicz, Piotr Popik, Agnieszka Nikiforuk

Zakład Badań Nowych Leków, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja, Polska Akademia Nauk

Rozwój technologii uczenia maszynowego zapoczątkował nową erę w metodach badawczych, także w analizie złożonych interakcji społecznych zwierząt. Tradycyjne metody oceny zachowań społecznych są niezwykle czasochłonne i narażone na subiektywne interpretacje badaczy. W odpowiedzi na te wyzwania, nowoczesne techniki informatyczne oferują szybką i obiektywną metodę analizy danych behawioralnych. Niniejsza praca skupia się na wykorzystaniu technik uczenia maszynowego do klasyfikowania zachowań społecznych szczurów, opierając się na dynamicznie rozwijających się, darmowych programach, takich jak DeepLabCut i Simple Behavioral Analysis (SimBA).

Celem badania było zweryfikowanie skuteczności narzędzi uczenia maszynowego w analizie zachowań społecznych par szczurów, porównując uzyskane wyniki z tradycyjnymi metodami oceny. Nagrania wideo interakcji szczurów w „wolnym polu”, zostały wykorzystane do wytrenowania sieci neuronowej przy pomocy pakietu DeepLabCut. Uzyskane dane numeryczne, reprezentujące części ciała zwierząt w przestrzeni i czasie, były następnie wykorzystywane do konstrukcji klasyfikatorów modeli zachowań społecznych w programie SimBA. Dokładność automatycznych oznaczeń została zweryfikowana poprzez porównanie uzyskanych wyników z manualnymi adnotacjami wykonanymi przez badaczy.

Wyniki badania wykazały wysoki stopień korelacji między automatyczną klasyfikacją zachowań szczurów przez DeepLabCut i SimBA a manualnymi adnotacjami, co świadczy o skuteczności narzędzi uczenia maszynowego w analizach behawioralnych. Integracja takich narzędzi w badania zachowań zwierząt stanowi istotny postęp w dziedzinie badań behawioralnych. Nasze badania sugerują, że analiza cyfrowa stanowi efektywne, praktyczne i łatwe w obsłudze rozwiązanie dla precyzyjnej oceny interakcji społecznych zwierząt.

Badanie zostało sfinansowane ze środków statutowych Zakładu Badań Nowych Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk oraz grantu Narodowego Centrum Nauki SONATA 17 2021/43/D/NZ5/00469

Prezentacja firmy Polygen Sp. z o.o., Gliwice

Bujak Karol

Polygen oferuje kompleksowe i innowacyjne rozwiązania do chromatografii cieczowej! Firma specjalizuje się w dostawie aparatury, kolumn i akcesoriów w zakresie: HPLC/UHPLC, FLASH, GPC/SEC, a także przeprowadza instalacje, szkolenia i prowadzi doradztwo techniczne.

Polygen dysponuje własnym, autoryzowanym serwisem oferowanej aparatury oraz posiada uprawnienia do przeprowadzenia procesów kwalifikacji IQ, OQ/PQ.

Polygen jest przedstawicielem renomowanych producentów aparatury jak: Thermo Scientific, Advion Interchim Scientific, Tosoh Bioscience, Shodex, Macherey-Nagel, Recipe, La-Pha-Pack, VICI, Chrom4.

W ofercie Polygen są również osmometry firmy Gonotec – An ELITech Group , aparatura do mikrodializy firmy CMA Microdialysis AB, generatory gazów firmy F-DGSi oraz zestawy do badań uwalniania substancji czynnej w lekach oraz zestawy do przygotowania mediów do uwalniania substancji czynnej firmy Riggtek. Polygen posiada własne laboratorium aplikacyjne.