



ZAŁĄCZNIK 4

AUTOREFERAT
OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH
DR KATARZYNA KUTER

ZAKŁAD NEUROPSYCHOFARMAKOLOGII
INSTYTUT FARMAKOLOGII POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Kraków 2019

Spis treści

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
3. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789):.....	2
A) Tytuł osiągnięcia naukowego.....	2
B) Lista prac.....	2
C) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.	4
1] Opracowanie modelu zwierzęcego wczesnej choroby Parkinsona wykazującego cechy kompensacji behawioralnej	7
2] Określenie roli superkompleksów oddechowych w w/w modelu w prążkowie i istocie czarnej szczerów w odpowiedzi na degenerację neuronów dopaminergicznych i jej kompensację w różnych punktach czasowych.....	9
3] Wskazanie białek mitochondrialnych i funkcji komórkowych zaangażowanych w dwóch fazach degeneracji i kompensacji układu czarnoprążkowiowego.....	11
4] Opracowanie modelu zwierzęcego przewlekłej dysfunkcji i uszkodzenia astrocytów w układzie czarnoprążkowiowym i wykazanie, że astrocyty są niezbędne do funkcjonalnej kompensacji zaburzeń motorycznych	14
5] Określenie zmian w wykorzystaniu substratów energetycznych i ekspresji kluczowych białek regulujących metabolizm w szlaku czarnoprążkowiowym w odpowiedzi na uszkodzenie astrocytów i/lub neurodegenerację oraz skorelowanie zmian z możliwością kompensacji	17
6] Określenie zmian w budowie i funkcjonowaniu kompleksów i superkompleksów oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach szlaku czarnoprążkowiowego w odpowiedzi na neurodegenerację i/lub uszkodzenie astrocytów oraz kompensację uszkodzenia.....	21
Referencje	24
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.....	30
A) Osiągnięcia naukowe przed i po uzyskaniu stopnia doktora.....	30
B) Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą	35
C) Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
D) Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

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

27 XI 2007 Tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, z wyróżnieniem. Praca doktorska pt. "Próba stworzenia zwierzęcego modelu choroby Parkinsona z wykorzystaniem pestycydu parakwatu u szczurów" wykonana w Instytucie Farmakologii, Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierunkiem prof. Krystyny Ossowskiej.

17 VI 2003 Tytuł mgr biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie. Praca magisterska pt. "Przygotowanie stabilnie transfekowanych linii komórkowych mysiej neuroblastomy NB41A3 konstruktami genetycznymi zawierającymi promotory receptorów dopaminowych D2 i D3 oraz gen reporterowy", wykonana na Wydziale Biotechnologii w Zakładzie Biochemii Komórki pod kierunkiem prof. Jolanty Jury.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Od VII 2011 Adiunkt w Zakładzie Neuropsychofarmakologii, Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

IX 2013 - III 2016 Postdoc w Zakładzie Biochemii Technicznego Uniwersytetu w Darmstadt, Niemcy.

VII 2007 - VI 2011 Asystent w Zakładzie Neuropsychofarmakologii, Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

X 2003 - VI 2007 Doktorant w Zakładzie Neuropsychofarmakologii, Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

VII - X 2003 Wykonawca grantu w Zakładzie Neuropsychofarmakologii Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

IX 1998 - VI 2003 Studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

3. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Wykazanie istotnej roli astrocytów w mechanizmach kompensujących degenerację neuronów dopaminergicznych i w regulacji energetyki komórkowej układu czarnoprążkowiowego w zwierzęcym modelu wczesnej choroby Parkinsona

B) Lista prac

Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę habilitacji zostały opublikowane w cyklu 5 prac oryginalnych, w latach 2016 – 2019.

1. Katarzyna Kuter, Manuela Kratochwil, Klemencja Berghauzen-Maciejewska, Urszula Głowacka, Michiru D. Sugawa, Krystyna Ossowska, Norbert A. Dencher
Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease
Biochim Biophys Acta. - Molecular Basis of Disease 2016 Apr;1862(4):741-53.
PMID:26844379; DOI: [10.1016/j.bbadis.2016.01.022](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.022) ; wydawnictwo Elsevier
IF = 5.476; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań 18
2. Katarzyna Kuter, Manuela Kratochwil, Sven H. Marx, Sonja Hartwig, Stephan Lehr, Michiru D Sugawa, Norbert A Dencher
Native DIGE proteomic analysis of mitochondria from substantia nigra and striatum during neuronal degeneration and its compensation in an animal model of early Parkinson's disease.
Arch Physiol Biochem. 2016 Jul 28:1-19.
PMID:27467289; DOI:[10.1080/13813455.2016.1197948](https://doi.org/10.1080/13813455.2016.1197948); wydawnictwo Taylor & Francis
IF = 1.220; punkty MNiSW = 20; liczba cytowań 2
3. Katarzyna Kuter, Łukasz Olech, Urszula Głowacka
Prolonged Dysfunction of Astrocytes and Activation of Microglia Accelerate Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Rat Substantia Nigra and Block Compensation of Early Motor Dysfunction Induced by 6-OHDA.
Mol Neurobiol. 2018 Apr;55(4):3049-3066
PMID: 28466266; DOI: [10.1007/s12035-017-0529-z](https://doi.org/10.1007/s12035-017-0529-z); wydawnictwo Springer
IF = 5.076; punkty MNiSW = 40. Liczba cytowań 4
4. Katarzyna Kuter, Łukasz Olech, Urszula Głowacka, Martyna Paleczna
Astrocyte support is important for the compensatory potential of the nigrostriatal system neurons during early neurodegeneration
J Neurochem. 2019 Jan;148(1):63-79.
PMID: 30295916; DOI: [10.1111/jnc.14605](https://doi.org/10.1111/jnc.14605) ; wydawnictwo John Wiley & Sons, Inc.
IF =4.609 ; punkty MNiSW = 30, liczba cytowań 0
5. Katarzyna Kuter, Łukasz. Olech, Norbert A. Dencher
Increased energetic demand supported by mitochondrial electron transfer chain and astrocyte assistance is essential to maintain the compensatory ability of the dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease
Mitochondrion. 2018 Dec 20. pii: S1567-7249(18)30095-3. [Epub ahead of print]
PMID: 30578987; DOI: [10.1016/j.mito.2018.12.002](https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.12.002) ; wydawnictwo Elsevier
IF =3.226 ; punkty MNiSW = 35; liczba cytowań 0

C) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Przyczyną zaburzeń motorycznych w **chorobie Parkinsona (PD)** jest poważne uszkodzenie dopaminergicznego układu czarnoprążkowiowego, przejawiające się sztywnością mięśniową, spowolnieniem ruchowym, bezruchem oraz drżeniami. PD jest wolno postępującą, nieodwracalną chorobą neurodegeneracyjną, ujawniającą się wraz ze starzeniem. PD i układ dopaminergiczny znajdował się w centrum moich zainteresowań od czasu studiów magisterskich. W pracy doktorskiej skupiłam się na opracowaniu nowego zwierzęcego modelu PD wywołanego pestycydami. Dało mi to szczegółowy wgląd w różne mechanizmy degeneracyjne zaangażowane w rozwój chorób centralnego układu nerwowego (CUN) i w to, jak powinno wyglądać prawidłowe modelowanie PD u zwierząt.

Szczególnie ciekawy fakt dotyczący właśnie PD to, że pierwsze objawy motoryczne obserwuje się dopiero, kiedy uszkodzone zostaje aż ok. 70% neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej (*substantia nigra* - SN), co skutkuje obniżeniem poziomu dopaminy (DA) o ok. 80% w jądrze ogoniastym i skorupie (*n. caudatus* i *putamen* - CP) u ludzi (Hornykiewicz 1998). Pojawianie się objawów motorycznych dopiero po tak znacznym, nieodwracalnym uszkodzeniu, dowodzi obecności silnych **mechanizmów kompensujących** powolny zanik neuronów dopaminergicznych, maskujących lub przeciwdziałających pojawianiu się zaburzeń na przedklinicznych etapach choroby (Zigmond *et al.* 1990; Zigmond 1997; Bezard & Gross 1998). **Te właśnie mechanizmy kompensujące powolną degenerację neuronów dopaminergicznych w mózgu, zaobserwowane w modelu PD opracowanym podczas doktoratu, stanowią od tej pory główny temat mojej pracy badawczej, analizowany z różnych punktów widzenia.**

Jako, że kompensacja funkcjonalna ubytków w liczbie neuronów zmusza pozostałe przy życiu neurony oraz inne komórki do nasilenia aktywności, prawdopodobnie zwiększa się także ich **zapotrzebowanie energetyczne**. Regulacja dostępności substratów energetycznych może być jednym z ważniejszych mechanizmów przyczyniających się do zdolności mózgu do kompensowania uszkodzeń. **Dlatego podjęłam się badania energetyki komórkowej CUN**, w czym istotnie pomogły mi wielokrotne wyjazdy stypendialne do Niemiec i współpraca z prof. Dencherem.

Za wsparcie energetyczne neuronów odpowiadają w głównej mierze komórki glejowe – **astrocyty**. Odbywa się to m.in. poprzez dostarczanie substratów do produkcji NADH i ATP. **Długotrwała dysfunkcja astrocytów mogłaby w znacznym stopniu upośledzić działanie neuronów**. W związku z tym **hipoteza badawcza tego cyklu prac zakładała, że dopóki astrocyty są w stanie energetycznie wspierać neurony w sytuacji stresowej, dopóty system jest stabilny. Natomiast po przekroczeniu pewnej granicy rozpoczyna się degeneracja neuronów**. W konsekwencji, manipulacja zasobami energetycznymi mogłoby pozwolić na wsparcie przedstawionego endogennego procesu kompensującego i lepszą terapię PD.

CELE NAUKOWO-BADAWCZE:

Celem cyklu prac było zbadanie roli astrocytów we wspieraniu potencjału mózgu do spontanicznego kompensowania uszkodzeń neuronów dopaminergicznego układu czarnoprążkowiowego. Badania te skupiały się na endogennej regulacji energetycznego metabolizmu komórkowego, zależnego od astrocytów.

W szczególności celem przeprowadzonych badań było:

- 1]** Opracowanie modelu zwierzęcego wczesnej choroby Parkinsona wykazującego cechy kompensacji behawioralnej.
- 2]** Określenie roli superkompleksów oddechowych w w/w modelu w prążkowie i istocie czarnej szczurów w odpowiedzi na degenerację neuronów dopaminergicznych i jej kompensację w różnych punktach czasowych.
- 3]** Wskazanie białek mitochondrialnych i pełnionych przez nie funkcji komórkowych zaangażowanych w dwóch fazach - degeneracji i kompensacji układu czarnoprążkowiowego.

- 4] Opracowanie modelu zwierzęcego przewlekłej dysfunkcji i uszkodzenia astrocytów w układzie czarnoprążkowiowym i wykazanie, że astrocyty są niezbędne do funkcjonalnej kompensacji zaburzeń motorycznych.
- 5] Określenie zmian w wykorzystaniu substratów energetycznych i ekspresji kluczowych białek regulujących metabolizm w szlaku czarnoprążkowiowym w odpowiedzi na uszkodzenie astrocytów i/lub neurodegenerację oraz skorelowanie zmian z możliwością kompensacji.
- 6] Określenie zmian w budowie i funkcjonowaniu kompleksów i superkompleksów oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach szlaku czarnoprążkowiowego w odpowiedzi na neurodegenerację i/lub uszkodzenie astrocytów oraz kompensację uszkodzenia.

WSTĘP:

Choroba Parkinsona

Przyczyna zapadalności na chorobę Parkinsona jest nadal nieznaną, mimo, że jest to jedna z najczęściej występujących schorzeń neurodegeneracyjnych i od momentu jej opisanie minęło ponad 200 lat! Niestety, dostępne leczenie jest jedynie objawowe i polega głównie na podawaniu dużych dawek prekursora DA (L-DOPA), co wywołuje silne skutki uboczne, po kilku latach jeszcze bardziej upośledzające pacjenta. Ponieważ brak wczesnej diagnostyki tej choroby, a pacjenci zgłaszają się do lekarza zazwyczaj dopiero po wystąpieniu objawów motorycznych, wszelkie próby terapii neuroprotektoryjnych nie mogą być zastosowane, gdyż w momencie rozpoznania większość neuronów dopaminergicznych już obumara. Degeneracja neuronów w CUN jest nieodwracalna. Tak późne rozpoznanie choroby jest głównie wynikiem maskowania objawów choroby na jej wczesnym etapie przez **mechanizmy kompensujące**. Z kolei **fakt, że mechanizmy te są wystarczające aby przeciwdziałać degeneracji aż do 70% neuronów w całej strukturze SN daje poczucie ogromu możliwości, jakie niósłoby zastosowanie ich kiedyś w praktyce.**

Mechanizmy kompensacyjne

Kompensacja to mechanizm pozwalający układowi na adaptację do zmienionych warunków po jego częściowym uszkodzeniu, w tym wypadku częściowej neurodegeneracji i podtrzymaniu jego funkcjonowania. Istnienie mechanizmów kompensacyjnych u pacjentów z PD jest powszechnie uznane ale wciąż nie znane jest ich podłoże komórkowe i molekularne. W licznych modelach zwierzęcych, zarówno u naczelnych jak i gryzoni wykazano, że częściowe uszkodzenie układu czarnoprążkowiowego jest funkcjonalnie kompensowane z czasem (Petzinger *et al.* 2006; Stanic *et al.* 2003b; Hornykiewicz 1998; Zigmond *et al.* 1990; Zigmond 1997; Bezard & Gross 1998; Finkelstein *et al.* 2000).

Mechanizmy kompensacyjne włączane podczas postępującej z wiekiem degeneracji neuronów zależą od wielkości uszkodzenia. Na wczesnych etapach funkcjonowanie układu jest zachowane ponieważ utrata neuronów jest mała i uzupełniana **funkcjonalną** adaptacją podnoszącą poziom DA do poziomu normalnego. Średniej wielkości uszkodzenia wymagają adaptacji **strukturalnych** i pojawia się niewielkie obniżenie poziomu DA. Największe uszkodzenia, powyżej 70% wiążą się z utratą funkcji przez układ i angażują również układy **postsynaptyczne** do kompensacji. Na tym etapie kompensacja nie jest już wystarczająco wydajna i dochodzi do pojawiania się objawów choroby i zaburzeń motorycznych. Widoczny jest duży spadek poziomu DA w CP (Robinson *et al.* 1994).

Jak dotąd poznano kilka z procesów zaangażowanych w kompensowanie zaburzeń motorycznych po uszkodzeniu układu dopaminergicznego w modelach zwierzęcych PD.

Adaptacje funkcjonalne neuronów dopaminergicznych, które przeżyły po uszkodzeniu SN widoczne są m.in. w postaci podniesionej ekspresji i aktywności enzymu syntetyzującego DA – hydroksylazy tyrozynowej (TH), zmniejszony wychwył zwrotny poprzez spadek aktywności transportera dopaminergicznego (DAT) oraz zwiększone uwalnianie DA z zakończeń (Robinson *et al.* 1994). Powoduje to utrzymanie się niemalże normalnego stężenia DA w synapsie. Wiadomo również, że pozostałe przy życiu neurony dopaminergiczne zwiększają częstość wyładowań w celu wyrównania transmisji dopaminergicznej. Adaptacje funkcjonalne są pierwszymi mechanizmami zaangażowanymi w proces kompensowania jeszcze niedużych ubytków neuronów dopaminergicznych. Podczas wolno postępującej degeneracji układu dopaminergicznego dochodzi do aktywacji kolejnych procesów i

zmian strukturalnych w neuronach dopaminergicznych i ich zakończeniach. M.in. udokumentowano rozrost zarówno ciał komórkowych, jak i rozgałęzień drzewek aksonalnych neuronów które przeżyły, dzięki czemu pojedyncze neurony pokrywają większy obszar struktury i mogą produkować więcej DA (Stanic *et al.* 2003a; Stanic *et al.* 2003b). Przy dużym uszkodzeniu układu czarnoprążkowiowego dochodzi do zmniejszenia transmisji dopaminergicznej pochodzącej z SN i CP. Deficyt ten jest częściowo niwelowany przez **wzrost lub modulowanie aktywności układów postsynaptycznych**. U zwierząt doświadczalnych zaobserwowano zwiększoną aktywność pośredniego szlaku GABAergicznego znakowanego proenkefaliną wychodzącego z prążkowiego (striatum – STR, odpowiednik CP u gryzoni) do gałki bladej oraz wzrost gęstości postsynaptycznych receptorów DA (Bezard & Gross 1998). Transmisja neuronalna pomiędzy wieloma strukturami mózgu regulowana jest na zasadzie wzajemnej sieci połączeń i w odpowiedzi dostosowuje aby skompensować ubytek neuronów. Zaburzenie transmisji dopaminergicznej w CP/STR wpływa na całość systemu CUN.

Astrocyty w patogenezie PD

Wcześniejsze badania nad PD skupiały się przeważnie na neuronach, nie uwzględniając roli astrocytów, traktowanych jedynie jako spoiwo tkankowe (*glia* – klej). W ostatnich czasach jednak zwraca się na nie szczególną uwagę. Komórki glejowe – astrocyty i mikroglej są kluczowymi wykonawcami stanu zapalnego w mózgu. Proces ten jest ważny zarówno w procesach inicjujących, jak i postępujących w PD. Zmiany patologiczne u pacjentów *post mortem* takie, jak ciała Lewiego i markery apoptozy widoczne są nie tylko w neuronach ale też w niektórych astrocytach (Kösel *et al.* 1997). Te zmiany nasilają się i rozprzestrzeniają wraz z trwaniem choroby (Braak *et al.* 2007; Wakabayashi *et al.* 2000). Komórki gleju pobierają nieprawidłowe cząsteczki α -synukleiny i ulegają w ten sposób aktywacji napędzając potencjalnie szkodliwy stan zapalny (Lee *et al.* 2010). W badaniach proteomicznych, u pacjentów wykazano zwiększoną ekspresję białek specyficznych właśnie dla astrocytów (GFAP, GMBF, galectin 1, sorcin A) i zaproponowano, że jest to efekt endogennej ochrony przed degeneracją neuronów (Werner *et al.* 2008). Podobnie, badania L'Episcopo w mysim modelu PD po podaniu toksyny MPTP wskazywały właśnie astrocyty, jako podstawę mechanizmu kompensacji uszkodzenia ukl. czarnoprążkowiowego (L'Episcopo *et al.* 2011).

Układ dopaminergiczny jest szczególnie wrażliwy w kontekście astrocytów ponieważ w SN jest ich stosunkowo mało w porównaniu do innych struktur mózgu. Natomiast znajduje się tam wiele komórek mikrogleju, który może być potencjalnie szkodliwy w przedłużającym się stanie zapalnym (Kim *et al.* 2000). Astrocyty w SN stanowią również oddzielną populację komórek znacznie różniącą się fenotypem od innych struktur (Emsley & Macklis 2006). Wszystkie powyższe fakty wskazują na **znaczącą rolę nie tylko neuronów ale również astrocytów w patogenezie PD**.

Funkcje astrocytów

Astrocyty są funkcjonalnie ściśle połączone z neuronami. Tworzą one system wsparcia CUN utrzymując homeostazę pozwalającą na optymalne działanie neuronów w mózgu (Hu *et al.* 2016). Chronią tkankę produkując antyoksydanty (kwas askorbinowy, GSH), wydzielając wiele czynników troficznych (NGF, BDNF, CNTF, GDNF, IGF-1, FGF-2, VEGF, ADNF) i współdziałając z mikroglejem w procesach zapalnych. Astrocyty wspierają neurony na wielu płaszczyznach, **strukturalnej, osmotycznej, troficznej, odpornościowej i energetycznej**.

Wsparcie energetyczne polega na pobieraniu glukozy z opłatanych przez astrocyty naczyń krwionośnych, syntezę mleczanu, ciał ketonowych, glutaminy i przesyłanie ich do neuronów, jako substraty energetyczne. W mózgu tylko astrocyty są zdolne do magazynowania zapasów energii w postaci glikogenu czy metabolizmu tłuszczu. Tylko one też produkują cholesterol potrzebny do budowy błon komórkowych (Bolaños 2016; Fernandez-Fernandez *et al.* 2012). Dzięki obecności receptorów dla neuroprzekaźników na swojej powierzchni (D1/2, α 1 i β 1/2, A1 i A2A) astrocyty dostosowują swój metabolizm do aktualnych potrzeb neuronów. W odpowiedzi na stres lub uszkodzenie astrocyty ulegają aktywacji i adaptują swoje funkcje produkując czynniki przeżyciowe i regenerujące. **Ponadto, funkcjonalna kompensacja degeneracji neuronów może zwiększać zapotrzebowanie przeżywających komórek na energię i uwrażliwiać system na wszelkie dysfunkcje astrocytów.**

Energetyka komórkowa w PD

Metabolizm neuronów jest uzależniony od astrocytów, które zużywają większą część glukozy dostępnej w mózgu. Przy patologicznie niskich zasobach glukozy i blokadzie oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach generującej ATP, neurony *in vitro* przeżywają, pod warunkiem, że są hodowane właśnie z astrocytami, posiadającymi rezerwy energetyczne. Same neurony dopaminergiczne mają wysokie tempo metabolizmu, a ich ciała komórkowe mają niewielką masę mitochondriów co czyni je szczególnie wrażliwymi na braki energetyczne a tym samym zależnymi od wsparcia energetycznego astrocytów (Fernandez-Fernandez *et al.* 2012; Liang *et al.* 2007; Pacelli *et al.* 2015). Dlatego **długotrwałe zaburzenie funkcjonowania astrocytów może leżeć u podłoża patologii PD nie tylko ze względu na brak wsparcia troficznego ale również ze względu na powstały deficyt energetyczny pogłębiany zwiększonym zapotrzebowaniem na rzecz kompensacji.**

W mózgach pacjentów *post mortem* wykazano deficyty w aktywności I kompleksu oddechowego w mitochondriach (Mann *et al.* 1992; Schapira *et al.* 1990b; Schapira *et al.* 1990a; Janetzky *et al.* 1994) i rozregulowanie właśnie szlaków sygnałowych wrażliwych na zmiany energetyczne. Defekty w wykorzystaniu glukozy i reagowaniu na zmiany jej poziomu zostały zaobserwowane już na wczesnych, przedobjawowych etapach choroby.

Dlatego hipoteza badawcza tego cyklu prac polegała na założeniu, że zmiany metabolizmu energetycznego głównie astrocytów, nie samych neuronów, wpływają na endogenne potencjały układu czarnoprążkowiowego do przeciwdziałania degeneracji.

OPIS OSIAGNIĘTYCH CELÓW

1] Opracowanie modelu zwierzęcego wczesnej choroby Parkinsona wykazującego cechy kompensacji behawioralnej

*Ta część osiągnięć została opublikowana w pracach (Kuter *et al.* 2016a; Kuter *et al.* 2018a).*

Aby można było badać procesy kompensacyjne w mózgu potrzebny był zweryfikowany i wiarygodny, powtarzalny model zwierzęcy. Dotychczasowe publikacje na ten temat pojawiały się niejako przy okazji innych badań nt. PD. Tutaj mechanizmy kompensacyjne były bezpośrednim celem badawczym a wystandaryzowany model kompensacji nie istniał.

Dlaczego w ogóle badać procesy kompensacyjne? Po uszkodzeniach w obwodowym układzie nerwowym dochodzi do częściowej regeneracji neuronów, natomiast śmierć neuronów w CUN i czarnoprążkowiowym układzie dopaminergicznym, jest nieodwracalna. Pomimo, że prowadzone są prace nad przeszczepami komórek do mózgu nadal nie jest to forma leczenia powszechnie dostępna dla pacjentów. Z kolei długość u ludzi wydłuża się, przez co gromadzące się z czasem uszkodzenia kumulują się, w coraz większym stopniu upośledzając funkcjonowanie starzejących się osób. PD jest jedną z chorób neurodegeneracyjnych ściśle związaną ze starzeniem. Potencjał jaki niosą ze sobą endogenne mechanizmy kompensacyjne jest ogromny. Poznanie ich pozwoliłoby np. na wsparcie ich aby przedłużyć normalne funkcjonowanie już zdiagnozowanych chorych. Ponadto, gdybyśmy wiedzieli co maskuje początkowe deficyty w PD moglibyśmy opracować wcześniejszą diagnostykę. Samo poznanie mechanizmów plastyczności i adaptacyjnych mózgu pozwoliłoby na próbę zachowania ich podczas starzenia.

Dlaczego badać procesy kompensacyjne właśnie w PD? Po pierwsze, istnienie tych mechanizmów u pacjentów z PD jest niezaprzeczalne. Po drugie, PD stanowi bardzo dobre tło do badania kompensacji w mózgu ponieważ za jej zaburzenia motoryczne odpowiada zasadniczo uszkodzenie jednego szlaku neuronalnego – dopaminergicznego układu czarnoprążkowiowego. W przebiegu PD zaburzone i uszkodzone są także inne układy ale to selektywne uszkodzenie SN/STR wywołuje deficyty motoryczne. Po trzecie, dotychczas w badaniach nad degeneracją nie zwracano uwagi na wielkość uszkodzenia, czy czas po uszkodzeniu w jakim analizowano zwierzęta a bardzo istotnie wpływa to na obserwowane zmiany i zmiany kompensacyjne mylnie brane były za np. neuroprotekcję. Wprowadza to chaos i błędy merytoryczne do badań naukowych i podjęcie tego tematu było kluczowe dla rozwoju badań nad PD.

Hipoteza badawcza tego cyklu prac zakładała, że uszkadzając układ dopaminergiczny w średnim stopniu uzyskamy zwierzęta, u których blisko jest do granicy zdolności kompensacji (ok 70%). W takim modelu będzie można stosunkowo łatwo badać czynniki przesuwające tę granicę, lub opracowywać czulsze testy diagnostyczne wcześniej wykrywające degenerację.

Do standaryzacji modelu kompensacji wykorzystaliśmy znaną selektywną toksynę dopaminergiczną 6-hydroksydopaminę (6-OHDA). Uszkodzenie jedynie neuronów dopaminergicznych jest wymagane do uzyskania zaburzeń motorycznych typu parkinsonowskiego. 6-OHDA jest transportowana do neuronów poprzez DAT i w ten sposób uszkadza jedynie neurony katecholaminergiczne. Ponieważ 6-OHDA wnika również w niewielkim stopniu przez transporter noradrenergiczny (NET), toksynę podaje się w osłonie blokującej go dezipraminy.

Wybraliśmy podanie toksyny do pęczka włókien przyśrodkowych (*medial forebrain bundle* – MFB) ze względu na progresywny rodzaj uszkodzenia. PD jest chorobą postępującą przez wiele lat i uszkodzenie rozwija się powoli. Modele zwierzęce oparte na podaniach toksyn wywołują o wiele szybsze uszkodzenia. Gdyby podać 6-OHDA bezpośrednio do SN, gdzie zlokalizowane są ciała neuronów dopaminergicznych uszkodzenie byłoby niemal kompletne i natychmiastowe, bez szans na kompensację. Z kolei podanie do STR, gdzie znajdują się dopaminergiczne zakończenia nerwowe rozwija się długo w czasie ale wywołuje znikome uszkodzenia w SN a jakiegokolwiek deficyty zachowania są bardzo szybko kompensowane. Dlatego podanie 6-OHDA do MFB, włókien dopaminergicznych przechodzących z SN do STR, stanowi idealny kompromis. Do pełnej degeneracji dochodzi po ok 2 tygodniach (dane własne nie publikowane). Śmierć komórek następuje powoli dzięki degeneracji wstecznej rozwijającej się wzdłuż włókien. Wielkość uzyskanego uszkodzenia SN wynosiła ok 50% i można ją zmieniać w zależności od podanej dawki toksyny. Uszkodzenie takiej wielkości pozostawia pulę neuronów, które mogą funkcjonalnie kompensować częściowy ubytek. Nie dochodzi także do uszkodzenia mechanicznego żadnej z badanych później struktur, SN czy STR.

Zmodyfikowany i przedłużony został test aktywności lokomotorycznej, dzięki któremu mogliśmy zidentyfikować nawet subtelne zmiany w zachowaniu zwierząt na przestrzeni wielu godzin, zawierających zarówno jasną jak i ciemną fazę dnia. Analiza taka bardziej odzwierciedlała typowe zachowanie zwierząt i uwzględnia cykl dobowy aktywności. Taki model badawczy pozwolił na dokładne zbadanie zmian w aktywności zwierząt w wielu punktach czasowych. Dzięki temu wyodrębnione zostały oddzielenie fazy przeważającego procesu aktywnej degeneracji od fazy gdy przeważa kompensacja. W analizie zachowania motorycznego zaobserwowano zaburzenia motoryczne u zwierząt (44% spadku po 3 dniach od podania toksyny) i ich zanikanie (po 4 tygodniach) w wyniku kompensacji funkcjonalnej. W późniejszej pracy zaobserwowaliśmy także fazę hiperkompensacji po 6 dniach od podania toksyny (Kuter *et al.* 2018a). W tym okresie zwierzęta są nawet bardziej aktywne niż kontrolne, pomimo postępującej i nieodwracalnej śmierci neuronów. Zmiany w aktywności motorycznej zwierząt postępują w sposób bardzo dynamiczny i każdy dzień od operacji daje inny wynik. Świadomość zachodzących procesów degeneracji vs kompensacji i uwzględnienie adaptacji przy analizowaniu wyników ma zasadnicze znaczenie dla interpretacji wyników. Np. analiza wyników w 6 dniu po uszkodzeniu – w fazie superkompensacji lub po 4 tygodniach może zasugerować brak zmian wywołanych leżą, co jest nie prawdą.

Metodą stereologicznego zliczania komórek udokumentowaliśmy tempo śmierci neuronów dopaminergicznych w SN oraz polu brzusznej nakrywki (*ventral tegmental area* – VTA) na preparatach immunohistochemicznych barwionych na obecność TH oraz i pozostałych neuronów fioletem kretylu. Po 3 dniach od podania toksyny umiera ok. 21% neuronów dopaminergicznych, natomiast po 4 tygodniach ok. 47% (Kuter *et al.* 2016a). Co istotne, wykazano że najpierw dochodzi do spadku ilości białka TH w neuronach a dopiero potem neurony umierają. Zatem utrata fenotypu neuronów dopaminergicznych poprzedza ich faktyczną śmierć (Kuter *et al.* 2016a). Wiele prac nt. PD używa TH, jako jedyne go markera degeneracji, co prowadzić może do błędnych wniosków.

Poziom DA, jej metabolitów (DOPAC, HVA, 3-MT) oraz tempo obrotu wykonano metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną. Degeneracji neuronów i jej kompensacji funkcjonalnej towarzyszyły zmiany w stężeniu DA i ich metabolizmie w SN i STR (Kuter *et al.* 2016a). W STR spadki DA widoczne były już po 3 dniach, natomiast w SN dopiero po 4 tygodniach, co odzwierciedla wolno postępującą od

zakończeń degenerację. Podniesiony obrót DA w STR towarzyszył spadkowi aktywności zwierząt a gdy ta została skompensowana, obrót także wrócił do poziomu kontrolnego, pomimo udokumentowanej śmierci neuronów. Parametrem bezpośrednio korelującym z odzyskiwaniem funkcjonalności układu był obrót DA mierzony proporcją 3-MT/DA, co może sugerować zwiększone uwalnianie DA z przeżywających zakończeń.

Podsumowanie: Wykazano, że opracowany model stanowi wiarygodny, powtarzalny i wystandaryzowany model zwierzęcy wczesnego etapu postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznych i uruchamianych w konsekwencji mechanizmów kompensujących deficyty w motoryce zwierząt. Opracowane przez nas podejście umożliwia zarówno unaocznienie deficytów motorycznych jak i ich kompensację, pomimo, średniego uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego, dzięki czemu zwierzęta bardzo dobrze przeżywają operacje. Stworzyliśmy narzędzie do badań *in vivo*, które stanowi bazę do której możemy dokładać kolejne aspekty badanie w kontekście kompensacji. Pozwoli on w dalszych badaniach łączyć go z analizą wpływu innych układów lub komórek, w tym opisaną poniżej dysfunkcji astrocytów oraz badać procesy i substancje farmakologiczne wpływające na degenerację lub jej kompensację.

2] Określenie roli superkompleksów oddechowych w w/w modelu w prążkowie i istocie czarnej szczurów w odpowiedzi na degenerację neuronów dopaminergicznych i jej kompensację w różnych punktach czasowych.

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracy (Kuter et al. 2016a).

W przebiegu patogenezy PD wykazano wiele różnych mechanizmów, takich jak zaburzenie degradacji białek i formowanie złogów, stres oksydacyjny, przedłużający się stan zapalny oraz dysfunkcję mitochondriów. W tym cyklu prac skupiłam się właśnie na mitochondriach i na zbadaniu zmian w aktywności enzymatycznej mitochondriów w odpowiedzi na przebieg degeneracji neuronów dopaminergicznych w układzie czarnoprążkowiowym i skorelowałam je z procesem kompensacji w czasie.

Istnieje wiele dowodów na zaangażowanie mitochondriów w patogenezę PD. U pacjentów z genetyczną formą PD wykazano mutacje m.in. w genach systemu kontroli jakości mitochondriów, PINK1 i *parkiny*. W przeciwieństwie do idiopatycznej PD, te formy genetyczne są odpowiedzialne na pojawienie się PD u osób młodych. Także inne białka zidentyfikowane w rodzinnych formach PD jak α -synukleina, DJ-1, LRRK2 regulują funkcje właśnie mitochondriów i stres oksydacyjny (Corti & Brice 2013). Dysfunkcje zaobserwowane w mitochondriach pacjentów to zaburzenia w procesie fosforylacji oksydacyjnej, zmiany morfologii i dynamiki mitochondriów, mutacje mtDNA, anomalie w homeostazie wapnia i wiązanie α -synukleiny do błon mitochondrialnych. Wiele z tych zmian jest selektywne dla SN (Subramaniam & Chesselet 2013). U pacjentów *post mortem* z zaawansowaną PD w SN zaobserwowano dysfunkcję kompleksów oddechowych (Cx) oksydatywnej fosforylacji, szczególnie Cx I (Mann *et al.* 1992; Schapira *et al.* 1990b; Schapira *et al.* 1990a; Janetzky *et al.* 1994). Wykazano również, że aktywność Cx IV i V w mózgu spada z wiekiem (Lin & Beal 2006). Obniżona aktywność Cx występuje w PD także poza mózgiem w mięśniach (Cx I, II i IV) (Bindoff *et al.* 1991) i płytkach krwi (Cx I, II/III) (Shults *et al.* 1997). Liczne badania wskazują, że zaburzenia funkcji mitochondriów może być jedną z przyczyn lub wczesnych objawów PD (Hattingen *et al.* 2009).

Mitochondrialne Cx oddechowe zbudowane są z kilku do kilkudziesięciu białek a ich funkcją jest przekazywanie elektronu w cyklu reakcji redoks ze zredukowanych nukleotydów NADH i FADH₂, na pełniący funkcję akceptora elektronów tlen. Dzięki generowaniu w ten sposób potencjałowi elektrochemicznemu (Cx I, III i IV) zachodzi synteza ATP (Cx V) i magazynowana jest energia. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej Cx oksydatywnej fosforylacji Cx I, III i IV tworzą jeszcze bardziej zorganizowane struktury nazwane **superkompleksami (SCx)**. SCx składają się z w/w Cx w różnych proporcjach stechiometrycznych (Schägger & Pfeiffer 2000; Acin-Perez & Enriquez 2014). Bliskie połączenie ze sobą różnych Cx wpływa na aktywność enzymatyczną każdego z nich (Schäfer *et al.* 2006; Wernicke *et al.* 2010) i ułatwia przesyłanie elektrony przez łańcuch oddechowy. Dzięki temu zwiększa

się wydajność procesu produkcji ATP i zmniejsza generowanie wolnych rodników tlenowych (ROS) jako produktów ubocznych (Genova & Lenaz 2013; Genova & Lenaz 2014; Maranzana *et al.* 2013).

Hipoteza badawcza tej części prac zakładała, po pierwsze że proces degeneracji neuronów dopaminergicznych może wpłynąć na aktywność enzymatyczną Cx oddechowych. Po drugie chcieliśmy zbadać czy neurony w SN oraz ich zakończenia w STR, które przeżyły uszkodzeni przez 6-OHDA i prawdopodobnie potrzebują zwiększonych zasobów energetycznych do kompensowania deficytów, dostosowują skład swoich SCx aby wydajniej produkować ATP. Sprawdzone także, czy zmiany w składzie i aktywności SCx będą korelować ze zmianami w płynności błony mitochondrialnej.

Te badania po raz pierwszy pokazały w sposób ilościowy zmiany w składzie i aktywności SCx po uszkodzeniu w układzie czaranoprążkowiowym i jego kompensacji (Kuter *et al.* 2016a). Odkryliśmy zmiany adaptacyjne w aktywności Cx I i IV oraz organizacji SCx i w płynności błony mitochondrialnej. Przebadana została aktywność enzymatyczna, wydajność i ilość Cx I i IV wchodzących w skład SCx m.in. zawierające wszystkie trzy Cx ($I_1III_2IV_{3/2/1}$), tylko dwa z nich (I_1III_2 , I_1IV_2 , I_1IV_1 , III_2IV_1) oraz indywidualnych form (Cx I_1 , Cx IV_1 , Cx IV_2) w mitochondriach wyizolowanych z SN i STR. Wykorzystano metodę elektroforezy natywnej (BN-PAGE) i przeprowadzono reakcje barwne w żelu dla wykazania aktywności enzymatycznej, wydajności i ilości poszczególnych form Cx i SCx. Płynność błon mitochondrialnych zbadano metodą anizotropii fluorescencji i sondy DPH.

Degeneracja neuronów dopaminergicznych obniżyła ilość Cx I będącego w składzie większości zidentyfikowanych SCx (SCx $I_1III_2IV_{3-1}$, SCx I_1III_2) oraz indywidualnego Cx I_1 w STR. Wydajność Cx I spadała tylko w formie SCx. Zmiany te były podobne w fazie degeneracji (4 dni) jak i w fazie pełnej kompensacji (4 tygodnie). Tylko aktywność SCx I_1IV_1 była podniesiona po 4 tygodniach.

Cx IV reagował odmiennie na uszkodzenie układu dopaminergicznego w STR. Nie było zmian w ilości Cx IV ale spadała jego wydajność w SCx $I_1III_2IV_{3-1}$ oraz I_1IV_{2-1} (Kuter *et al.* 2016a). Aktywność enzymatyczna Cx IV nieznacznie spadała 4 tygodnie po operacji. Indywidualne formy Cx IV nie wykazały zmian.

Bardzo ciekawe wyniki uzyskano w SN. Degeneracja ok 50% neuronów dopaminergicznych w SN sprawiła, że pula Cx I występująca indywidualnie poza SCx przesunęła się do formy związanej w SCx (Kuter *et al.* 2016a). Wydajność Cx I w SCx wzrosła faworyzując formy wyżej uorganizowane w 4 dniu po operacji – podczas aktywnej degeneracji neuronów. W fazie skompensowanej, po 4 tygodniach ilość Cx I adaptacyjnie zwiększyła się zarówno w SCx jak i indywidualnej formie Cx I_1 .

Aktualne hipotezy badawcze publikowane sugerują, że **organizowanie Cx oddechowych w wyższe formy SCx zwiększa ich wydajność** (Schäfer *et al.* 2006; Genova & Lenaz 2014; Maranzana *et al.* 2013; Schon & Dencher 2009). Nasze badania potwierdzają tę hipotezę. Zaobserwowana aktywność Cx I w SCx była większa niż indywidualnego Cx I. Nie związany Cx I_1 stanowił jedynie 15% - 18% całej jego puli w STR i SN, odpowiednio. Potwierdza to wcześniejsze badania (Buck *et al.* 2014). Z kolei Cx IV_{2-1} w większości występuje w formach indywidualnych (79%) ale jego aktywność enzymatyczna również jest wyższa wewnątrz SCx (Kuter *et al.* 2016a). Dlatego **reorganizacja SCx może stanowić najszybszą formę regulowania wydajności funkcjonowania szlaku oksydatywnej fosforylacji i w konsekwencji produkcji ATP, dostosowujący ją do aktualnych potrzeb komórek, bez potrzeby syntezy nowych białek**. W tych badaniach pokazaliśmy, że poszczególne formy SCx zmieniają się pod wpływem degeneracji neuronów w różny sposób co mogłoby wskazywać, że mają one odmienne funkcje.

Płynność błon mitochondrialnych

Na funkcjonowanie i skład SCx wpływa bezpośrednio płynność błony mitochondrialnej. Właściwości fizykochemiczne błon zależą w dużej mierze od ich składu, w tym ilości i jakości fosfolipidów, kardiolipiny lub cholesterolu oraz proporcji białek. Płynniejsza błona ułatwia przemieszczanie się białek i zmiany jej kształtu (Acin-Perez & Enriquez 2014; Benard & Rossignol 2008; Nicolson 2014). Nawet niewielkie zmiany w płynności błon są krytyczne dla utrzymania homeostazy i wydajnego funkcjonowania komórki, szczególnie jak chodzi o plastyczność i przeżycie (Eckmann *et al.* 2013). Płynność błony moduluje aktywność zanurzonych w niej białek (García *et al.* 2011; García *et al.* 2014). Znane jest wiele czynników usztywniających błony, m.in. stres oksydacyjny, będący też jedną z potencjalnych mechanizmów śmierci neuronów dopaminergicznych w PD (García *et al.* 2011). ROS

zwiększają stopień wysycenia tłuszczu i zmieniają ich konformację. Dlatego też z wiekiem błony w mózgu stają się mniej płynne (Sugawa *et al.* 1996). W CP pacjentów z PD wykazano zmniejszony recycling błon powodowany zaburzeniem energetyki komórkowej (Hattingen *et al.* 2009). Odnotowano również drastyczny spadek ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w korze czołowej pacjentów, co z pewnością obniża płynność błon (Fabelo *et al.* 2011). Dlatego też zaburzona homeostaza lipidowa może być odpowiedzialna za niektóre formy PD. Badania na zwierzętach pokazały, że zwiększona ekspresja α -synukleiny zmniejszała płynność błon neuronów, co również może mieć przełożenie na patomechanizm PD (Sharon *et al.* 2003). Co istotne, zmiany we właściwościach błon zaobserwowano już na wczesnych etapach choroby (Witt 2014). W związku z powyższym, **hipoteza tych badań zakładała że proces degeneracji neuronów dopaminergicznych może również dotyczyć błon mitochondrialnych i ich płynności a tym samym wpływać bezpośrednio na skład SCx oddechowych i funkcjonowanie mitochondriów w mózgu.**

Zaobserwowane przez nas zmiany w płynności błony mitochondrialnej w korelowały ze zmianami zaobserwowanymi w wydajności funkcjonowania SCx (Kuter *et al.* 2016a). Nasza praca po raz pierwszy pokazała w sposób ilościowy zmiany w płynności błon mitochondrialnych w SN i STR wywołane degeneracją neuronów dopaminergicznych i kompensacją uszkodzeń u szczura w odniesieniu do funkcjonowania i składu SCx. W SN błony były bardziej sztywne na etapie postępującej degeneracji i korelowały z zaobserwowanym wzrostem wydajności Cx I i przesunięciem indywidualnej jego formy do SCx. Wyniki te wspierają hipotezę, że sztywniejsze błony mitochondrialne promują wyższe uorganizowanie Cx w SCx. Błony mitochondrialne izolowane z STR były bardziej płynne po uszkodzeniu neuronów co może odzwierciedlać procesy plastyczności aktywowane adaptacyjnie. Zwiększona płynność błon korelowała ze zmniejszoną wydajnością Cx oddechowych. Bardziej płynne błony związane są raczej z lepszymi parametrami ochronnymi komórek i z ułatwionym przesyłaniem białek błonowych odpowiedzialnych za odporność na stres oksydacyjny. Wykazano, że linie komórkowe i tkanki mózgu bardziej odporne na stres (mózdzek) mają mniej sztywne błony (Clement *et al.* 2010; Sugawa *et al.* 1996; Chochina *et al.* 2001). Zwiększona płynność błon mitochondrialnych w STR w naszym modelu badawczym może wskazywać na nasilone procesy adaptacyjne i naprawcze

Podsumowanie: degeneracja neuronów dopaminergicznych i uruchamianie w konsekwencji mechanizmy kompensujące wpływają na funkcjonowanie mitochondriów, wywołują zmiany w strukturze i wydajności Cx i SCx oddechowych i korelują ze zmianami w płynności błon mitochondrialnych. SCx, wyżej zorganizowane formy Cx wydają się być preferowane w procesie adaptacji mitochondriów do uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego, co może wskazywać na adaptacje kompensująca zwiększone zapotrzebowanie na energię.

3] Wskazanie białek mitochondrialnych i funkcji komórkowych zaangażowanych w dwóch fazach degeneracji i kompensacji układu czarnoprążkowiowego

*Ta część osiągnięć została opublikowana w pracy (Kuter *et al.* 2016b).*

Badanie mitochondrialnych kompleksów oddechowych, ich składu i formowania się w wyższe formy SCx zaowocowało pojawieniem się kolejnych pytań badawczych. Udało nam się wcześniej określić zmiany w aktywności i występowaniu poszczególnych SCx i Cx mitochondrialnych ale Cx oddechowe złożone są z różnych nie enzymatycznych podjednostek białkowych, które regulują ich aktywność i determinują budowę. Ponadto mitochondria posiadają wiele innych funkcji niż fosforylacja oksydacyjna i generowanie ATP. Dlatego zainteresowały nas zmiany ilościowe w całym proteomie mitochondrialnym. Pozwoliło nam to na wskazanie ścieżek molekularnych i procesów zaangażowanych w neurodegenerację jak i kompensację.

Aby wcześniejsze wyniki badania aktywności enzymatycznej mitochondriów można było bezpośrednio skorelować z danymi proteomicznymi analizy wykonano na tych samych mitochondriach izolowanych z tkanek SN i STR po uszkodzeniu układu czarnoprążkowiowego. Umożliwiło nam to również bezpośrednią korelację z procesem degeneracji i wcześniejszymi analizami behawioralnymi. W ten

sposób przeanalizowane zostały ilościowe zmiany w dwóch fazach degeneracji neuronów – postępującej i skompensowanej. Użyto metody dwukierunkowej elektroforezy białek natywnych a następnie zdenaturowanych (2D BN/SDS) przeprowadzonej równocześnie na 3 próbkach wyznakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Rozdział 3 próbek równocześnie w tym samym żelu (2 badane, 1 standard ilości) pozwala na ilościową analizę różnicową (*Difference Gel Electrophoresis*, DIGE). Jest to najdokładniejsza a zarazem wysoce wydajna metoda dostępna obecnie do badania całych proteomów. W żelach 2D BN/SDS mogliśmy nie tylko zidentyfikować pojedyncze białka ale również przypisać je do konkretnego SCx. Na żelach wyodrębniono 191 pozycji pojedynczych w próbkach z SN i 206 w próbkach z STR. Statystycznie istotne zmiany ilościowe wykazały odpowiednio 47 i 69 białka. Metodą spektroskopii mas i peptydowego odcisku palca (MS-MALDI TOF/TOF *Peptide Mass Fingerprint Analysis*) zidentyfikowano 64 i 70 z tych białek (Kuter *et al.* 2016b).

Zmiany ekspresji podjednostek Cx oddechowych i białek metabolizmu energetycznego

Analiza DIGE pojedynczych białek należących do poszczególnych SCx potwierdziła wcześniejsze wyniki na całych SCx w STR (Kuter *et al.* 2016a). Większość białek należących do Cx I (zarówno podjednostek strukturalnych jak i katalitycznych) wykazała postępujący w czasie spadek ilości. Najmniej istotne zmiany dotyczyły białek wchodzących w skład większych SCx, natomiast największe zmiany widoczne były w białkach należących do mniejszych SCx i indywidualnego Cx I, podobnie jak wykazano wcześniej w badaniach składu i ilości różnych form SCx i Cx (Kuter *et al.* 2016a). Analogiczny spadek ilości dotyczył podjednostek Cx III, który wchodzi w skład większości SCx.

W SN nie udało nam się potwierdzić sugerowanego wcześniejszymi badaniami kompensacyjnego wzrostu ilości Cx I (Kuter *et al.* 2016a). Wszystkie zidentyfikowane podjednostki Cx I należały do części strukturalnych, nie katalitycznych Cx. Natomiast **wszystkie białka należące do Cx IV wskazywały na postępujący z czasem wzrost ilości, co może sugerować proces kompensacji energetycznej w SN.**

Zestawienie naszych wyników z wcześniejszymi doniesieniami w podobnym modelu zwierzęcym (Lessner *et al.* 2010) sugerowało **kompensacyjny wzrost ilości samych mitochondriów w przeżywających komórkach i tkance STR.** Ten temat wymaga dalszych badań. Na drugi, prawdopodobny mechanizm kompensacyjny w postaci **adaptacji do zwiększonego zapotrzebowania na energię kompensującej tkanki wskazuje wzmożona ekspresja białek metabolizmu węglowodanów** (np. akonitaza 2, hexokinaza-1), zarówno w naszych badaniach w SN jak i w badaniach Lessner'a.

Białka wskazujące na przemodelowanie i regenerację tkanki po uszkodzeniu

Zaobserwowane przez nas zmiany ilościowe proteomu wskazały na aktywny proces przemodelowania strukturalnego komórek (Kuter *et al.* 2016b). Jednym z ciekawych białek zmieniających ekspresję podczas degeneracji i kompensacji uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego było białko DPYSL2 (dihydropyrimidinase-related protein 2) znane również pod nazwą CRMP2 (collapsin response mediator protein-2). W SN jego ilość malała w 4 dniu po rozpoczęciu degeneracji neuronów a po 4 tygodniach wracała do poziomu kontrolnego. W STR jego ilość znacząco rosła w obydwu badanych punktach czasowych, wskazując na kompensacyjny rozrost zakończeń nerwowych. DPYSL2 ulega rozpadowi proteolitycznemu w degenerujących neuronach i udokumentowano jego znaczenie w rozroście aksonów i regeneracji. Należy do grupy białek związanych z neuroplastycznością i reguluje różnicowanie się neuronów oraz znajdowanie ścieżki wzrostu podczas wzrostu aksonów (Sun & Cavalli 2010). Również inne badania wskazywały na upregulację DPYSL2 w STR szczurów w 3 miesiące po wywołania uszkodzenia przez podanie 6-OHDA do MFB, podobnie jak w naszych badaniach (Lessner *et al.* 2010). Inne modele badawcze uszkodzenia zarówno centralnego jak i obwodowego układu nerwowego korelują wzrost ilości DPYSL2 korelujący z regeneracją neuronów (Jiménez *et al.* 2005). Również białka wchodzące w interakcje z DPYSL2 (dynein, dynamin, myosin, alpha-actinin-4, neuronal membrane glycoprotein M6-a), a także inne zaangażowane w różnicowanie komórek, transport pęcherzyków i białka strukturalne, (unconventional myosin-I α and I β , dynein heavy chain 7, adenyllyl cyclase-associated protein 2, protein kinase C zeta, retinol-binding protein 2, glycoprotein M6-a, zinc finger and BTB domain-containing protein 38, 4F2 cell-surface antigen heavy chain), czy odpowiedzialne za syntezę i składanie nowych białek (Ras-related protein Rab-2A, 60 kDa heat shock

protein) wykazały zmiany ekspresji w naszych badaniach potwierdzając nasilenie procesu aktywnego przemodelowania tkanki, kompensacyjny wzrost aksonów i regenerację w procesie degeneracji i kompensacji.

Co ciekawe ilość DPYSL2 spada z wiekiem, co może być przyczyną zmniejszonej plastyczności i odporności starzejącego się mózgu (Sun & Cavalli 2010; Triplett *et al.* 2016). Ponieważ oznaki przemodelowania strukturalnego widoczne były też u pacjentów z PD postulujemy, że DPYSL2 może być istotnym markerem procesów degeneracji i kompensacji w mózgu na wczesnych etapach choroby.

Zmiany ekspresji białek ochronnych

Wśród białek zmieniających ekspresję w odpowiedzi na degenerację neuronów dopaminergicznych widoczna była też grupa białek ochronnych (*chaperones*), należących do tzw. białek szoku cieplnego (*heat shock proteins*, HSP). Ułatwiają właściwe fałdowanie nowych białek po translacji i ich import. Stabilizują wczesne formy białek aby zapobiec ich agregacji i ułatwić składanie w większe kompleksy białkowe. Ilość HSP70-4 (heat shock 70 kDa protein 4) była podniesiona w SN, podobnie jak HSP60 w SN i STR. Analogicznie, jak w przypadku DPYSL2 zmiany HSP w STR widoczne były wcześniej niż w SN, co koresponduje z większym potencjałem kompensacyjnym dopaminergicznych zakończeń nerwowych niż ciał neuronów. HSP60 jest zaangażowane w import i fałdowanie białek mitochondrialnych. Wiadomo, że jego ilość wrasta w stresie komórkowym i jest to korzystne dla jej przeżycia. Wcześniejsze doniesienia innych grup wykazały korelację podniesionego poziomu HSP60 z odzyskiwaniem sprawności fizycznej przez zwierzęta po uszkodzeniu STR przez 6-OHDA i przeszczepie komórek (Zhao *et al.* 2016). Zmiany w ekspresji HSP ponownie wskazują na proces przemodelowania w odpowiedzi na uszkodzenie układu czarnoprążkowiowego.

Zmiany ekspresji białek wpływających na transmisję dopaminergiczną i glutaminianergiczną

Wykazaliśmy również zmiany w zawartości białek istotnych dla funkcjonowania neuronów dopaminergicznych (sodium/potassium-transporting ATPase, Na/K ATPaza, podjednostki alfa 3 (ATP1A3) i beta 1) i glutaminianergicznych (excitatory amino acid transporter 2, EAAT2). W SN podjednostka katalityczna ATP1A3 wykazała wzrost ekspresji po 4 tygodniach, w fazie skompensowanej degeneracji. Ilość podjednostki nie-katalitycznej beta 1 była zwiększona w obu punktach czasowych i strukturach. ATP1A3 jest istotnym białkiem, specyficznym dla neuronów, które generuje gradient elektrochemiczny poprzez błonę komórkową ważny dla transportu energii i nutrientów (Heo *et al.* 2012; Dobretsov & Stimers 2005). Podjednostka beta 1 z kolei reguluje tworzenie heterodimerów Na/K ATPazy, jest zaangażowana w adhezję komórkową, wytyczanie polaryzacji komórki oraz mitofagie. Zmiany ekspresji Na/K ATPazy wskazują na adaptacje mitochondriów w przeżywających neuronach. Wiadomo, że mutacje genu dla ATP1A3 wywołują dystonie typu parkinsonowskiego o wczesnym początku (de Carvalho Aguiar *et al.* 2004). Białko to tworzy z α -synukleina fibryle i oligomery na powierzchni błony, zaburzając funkcje neuron (Shrivastava *et al.* 2015). Co równie istotne, manipulacje aktywnością Na/K ATPazy wpływają na wychwyty zwrotny DA i serotoniny oraz wchodzi w interakcje z receptorami D₁ i D₂ (Steffens & Feuerstein 2004; Zhang *et al.* 2013; Hazelwood *et al.* 2008). Zaobserwowana przez nas podniesiona ekspresja ATP1A3 i zwiększony obrót DA w STR idą w parze z kompensacyjną adaptacją transmisji dopaminergicznej po częściowym uszkodzeniu układu czarnoprążkowiowego.

EAAT3 to białko obecne głównie w astrocytach i odpowiada za wychwyty zwrotny glutamianu z synapsy, a tym samym wyłączenie pobudzenia postsynaptycznego. W naszych badaniach ekspresja tego białka była podniesiona zarówno w SN jak i STR w obydwóch punktach czasowych po wywołaniu uszkodzenia neuronów dopaminergicznych. W PD równowaga pomiędzy transmisją dopaminergiczną a glutaminianergiczną jest zaburzona (Ossowska 1993; Ossowska *et al.* 2007), stąd EAAT2 stanowi potencjalny cel biologiczny w terapii jej objawów (Chotibut *et al.* 2014; Fontana 2015). Podniesiona ekspresja EAAT2 w naszym modelu badawczym może być odpowiedzialna za odwracanie się deficytów behawioralnych za czasem po uszkodzeniu neuronów (Kuter *et al.* 2016a). W innych badaniach, skupiającymi się na większych, nie kompensowanych uszkodzeniach układu czarnoprążkowiowego, zazwyczaj obserwowano spadki ilości EAAT2 (Chung *et al.* 2008; Chotibut *et al.* 2014). Nasze wyniki wskazują, że EAAT2 może być szczególnie istotny we wczesnych etapach degeneracji neuronów dopaminergicznych i w procesie kompensacji, a tym samym stanowić dobry marker.

Podsumowanie: Wzrost ilości białek należących do Cx IV oraz metabolizmu węglowodanów może sugerować proces kompensacji zwiększonego zapotrzebowania energetycznego komórek w SN. Zidentyfikowano wzrost ilości białek odpowiedzialnych za reorganizację cytoszkieletu, syntezę i składanie nowych białek, transport organelli, kompensacyjny wzrost aksonów i regenerację. Analiza DIGE wskazała, że białka DPYSL2, HSP60, ATP1A3, EAAT2 mogą stanowić markery wczesnej degeneracji i kompensacji uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego.

4] Opracowanie modelu zwierzęcego przewlekłej dysfunkcji i uszkodzenia astrocytów w układzie czarnoprążkowiowym i wykazanie, że astrocyty są niezbędne do funkcjonalnej kompensacji zaburzeń motorycznych

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracach (Kuter et al. 2018a; Kuter et al. 2019).

Liczne badania wskazują, że w przebiegu PD dysfunkcja astrocytów i patologiczna aktywacja mikrogleju wyprzedzają pojawianie się pierwszych objawów motorycznych. Dodatkowo, naturalny proces starzenia, kluczowy w PD, wywołuje morfologiczne zmiany w ludzkich astrocytach, widoczne jako zwiększenie ekspresji GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) i ich subtelną aktywację (Jyothi *et al.* 2015). W przeciwieństwie do neuronów w dalszym ciągu niewiele wiadomo o roli astrocytów w procesach, zarówno degeneracji, jak i kompensacji uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w układzie czarnoprążkowiowym. Astrocyty stanowią naturalne wsparcie neuronów zarówno pod względem troficznym, strukturalnym jak i energetycznym. **Długotrwałe zaburzenie ich funkcjonowania może narażać neurony na uszkodzenie i leżeć u podłoża patogenezy PD. Z drugiej strony zaburzenie funkcji astrocytów już w trakcie postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznych mogłoby osłabiać mechanizmy kompensujące.**

Aby zbadać te hipotezy potrzebny był odpowiedni model zwierzęcy. Dotychczasowe badania interakcji neuron – glej prowadzone były w hodowlach *in vitro* nie odzwierciedlających wielowymiarowości tkanki. Badania *in vivo* prowadzone w modelach genetycznie zmodyfikowanych, w których permanentnie usuwa się populację astrocytów nie uwzględniają wewnętrznej adaptacji komórek niezbędnej do przeżycia zmodyfikowanego organizmu. Nie dotyczyły one też dotychczas układu dopaminergicznego (Lee *et al.* 2014; Nishiyama *et al.* 2002; Cui 2001; Schreiner *et al.* 2015). Z kolei znane modele uszkodzenia astrocytów wywoływane toksynami opierały się na jednorazowym wywołaniu śmierci astrocytów nie odzwierciedlając chronicznego aspektu ich dysfunkcji (Fonnum *et al.* 1997; Hassel *et al.* 1992; Hassel *et al.* 1994; Paulsen *et al.* 1987; Paulsen *et al.* 1988; Canals *et al.* 2008; Hirose *et al.* 2007; Rodriguez Diaz *et al.* 2005; Zielke *et al.* 2009). Do naszych badań potrzebny był model selektywnego uszkodzenia astrocytów w konkretnej strukturze – SN, trwający co najmniej tydzień. Aby móc badać rolę dysfunkcji astrocytów w kontekście degeneracji układu czarnoprążkowiowego i jego funkcjonalnej kompensacji model ten musiał być połączony z wyżej opisanym, zweryfikowanym i wystandaryzowanym modelem 6-OHDA u szczura.

Wykorzystaliśmy dobrze opisaną toksynę selektywną dla astrocytów – fluorocytrynian (FC). Wcześniejsze badania wykazywały, że podanie dostrukturalne FC wywoływało dysfunkcję astrocytów zależną od dawki toksyny. Jeśli dawka nie zabijała komórek gleju, jej efekty były odwracalne po 48 godzinach (Paulsen *et al.* 1987; Zielke *et al.* 2007; Zielke *et al.* 2009). W związku z tym podawaliśmy niską dawkę FC (2 nmol/24 godziny) w stałej, powolnej infuzji pompkami osmotycznymi przez 7 dni, w tempie 0.5 ul/godzinę (Kuter *et al.* 2018a; Kuter *et al.* 2019). Podczas, gdy miniaturowe pompki osmotyczne były zaimplantowane pod skórą zwierzęcia na grzbiecie, FC był podawany drenami i kaniulą zaimplantowaną na czaszce bezpośrednio do SN. Po 7 dniach zwierzęta były dekapitowane i pobierano tkanki do dalszych badań lub pompki wyjmowano i zwierzęta dożywały 4 tygodni po operacji. Zwierzęta kontrolne były również operowane i implantowano im kaniule z zamkniętymi drenami aby odwzorować warunki operacji i mechanicznej ingerencji kaniul w tkankę. U połowy zwierząt podano również, jednorazowo, 6-OHDA (lub kontrolnie jego rozpuszczalnik - kwas

akorbinowy) do MFB w trakcie tej samej operacji. Uszkodzenie układu czarnoprążkowiowego wykonano wg. wcześniej opracowanej procedury dot. modelu kompensacji (Kuter *et al.* 2016a).

Wykonano pomiary aktywności lokomotorycznej w kilku punktach czasowych. Po rozpoczęciu podawania FC testy wykonano w 3, 4, 5 i 6 dniu oraz po wyjęciu pompek i zaprzestaniu infuzji FC w 26 i 27 dniu po operacji. Testy wykonywane były w sposób analogiczny jak przy opracowywaniu modelu samej degeneracji neuronów dopaminergicznych i standaryzacji procesu funkcjonalnej kompensacji (Kuter *et al.* 2016a), aby uzyskane wyniki można było odnieść do siebie. Zweryfikowano liczbę astrocytów w SN używając: metody stereologicznego zliczania komórek barwiących się na obecność białka S100, metody Western blot i oznaczenia ilości białek specyficznie astrocytarnych GFAP, S100beta, syntetazy glutaminy (*glutamine synthetase*, GS), ALDH1L1 oraz wykonano analizę densytometryczną S100 na skrawkach. Liczbę neuronów dopaminergicznych i nie dopaminergicznych w SN policzono stereologicznie po wybarwieniu na obecność TH i fioletem krezylu. Wykonano też analizę Western blot ilości TH w homogenatach tkanki. Dodatkowo, sprawdzono stężenie DA, jej metabolitów oraz obrót w homogenatach z SN i STR aby zweryfikować wielkość uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego i metabolizm DA. Mikroglej wybarwiono w tkance SN na obecność Iba1 i przeanalizowano jego stan aktywacji na podstawie morfologii. Dodatkowo oznaczono ilość białka Iba1 w homogenatach tkanki SN.

Przewlekłe uszkodzenie astrocytów

Barwienie tkanki SN na obecność markerów astrocytów GFAP (zlokalizowany w zakończeniach i oddający morfologię komórek) oraz S100 (zlokalizowany w ciałach komórkowych i ułatwiający ich zliczenie) pokazało jednoznacznie spadek gęstości komórek astrocytów wokół miejsca podania toksyny po 7 dniach infuzji FC (Kuter *et al.* 2018a). Na obrzeżach działania FC widać było pojedyncze zaktywowane komórki o pogrubionych wypustkach. Analiza stereologiczna potwierdziła spadek ilości astrocytów o 26% i 42.8% w grupach z samym FC i FC z 6-OHDA. Analiza densytometryczna białka S100, spadek ilości białka S100beta, ALDH1L1 oraz GS w SN również potwierdziły zanik astrocytów. Nieco odmienny wynik pokazała analiza Western blot ilości GFAP. Po 7 dniach pod podania FC nie było spadków ilości GFAP. Wynika to z faktu, że GFAP pod wpływem aktywacji astrocytów ulega nadekspresji co widoczne było na skrawkach. Dlatego mniejsza liczba astrocytów posiadała więcej GFAP niż normalne komórki i niwelowała efekt degeneracji astrocytów. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, że aktywowane astrocyty stają się hipertroficzne i wykazują nadekspresję GFAP (Strömberg *et al.* 1986; Henning *et al.* 2008; Hol & Pekny 2015) oraz, że ulegają aktywacji przed apoptozą (Takuma *et al.* 2004). Dlatego GFAP nie jest jednoznacznym markerem ilościowym, który można odnieść do liczby komórek a odzwierciedla bardziej stan aktywacji astrocytów.

Po 4 tygodniach od operacji, czyli po 7 dniach podawania FC i 3 tygodniach odstawienia efekt uszkodzenia astrocytów był odwracany. Więcej komórek barwiących się na obecność S100 i GFAP było widocznych w rejonie infuzji sugerując proliferację komórek i uzupełnienie puli astrocytów, co potwierdziło liczenie stereologiczne. Gęstość astrocytów wróciła do poziomu kontrolnego 96.8% i 81.7% odpowiednio dla grupy z samym FC oraz FC z 6-OHDA. Również wynik analizy densytometrycznej S100 i ilości S100beta w homogenatach był zbliżony do poziomu kontrolnego. Ilość białka GFAP oraz ALDH1L1 w homogenatach tkanki przewyższył kontrole, co świadczy o powrocie liczby astrocytów do niemalże kontrolnego poziomu oraz o utrzymującej się ich aktywacji. Z naszych badań wynika, że podczas gdy GFAP w największym stopniu odzwierciedla aktywację astrocytów, to białko ALDH1L1 jest markerem pośrednim, łączącym czynnik zarówno ilościowy a aktywacją, natomiast GS i S100beta stanowią miarodajne odzwierciedlenie ilościowe komórek astrocytów.

U zwierząt po podaniach samego 6-OHDA do MFB nie wywołało zmian w ilości astrocytów czy ekspresji ich białek.

Wpływ uszkodzenia astrocytów na mikroglej

Istotnym wynikiem naszych badań, zazwyczaj pomijanym w interpretacji wyników dotyczących astrocytów była obserwacja drastycznej aktywacji mikrogleju w odpowiedzi na uszkodzenie astrocytów (Kuter *et al.* 2018a). Dla odmiany, aktywacja mikrogleju po uszkodzeniu neuronów była minimalna. Dowodzi to, jak silna jest interakcja astrocyt – mikroglej i, że jest ona o wiele silniejsza niż interakcja glej-neuron. Analiza uzyskanych wyników sugeruje także, że przynajmniej niektóre zaobserwowane

zmiany jak np. zwiększony obrót DA czy zmiany energetyki komórkowej opisane w dalszej części mogą zależeć nie tylko od degeneracji astrocytów lecz także od aktywacji mikrogleju.

Wpływ uszkodzenia astrocytów na degenerację neuronów dopaminergicznych

Podobnie, jak w opisanym powyżej modelu uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego i kompensacji po podaniu 6-OHDA do MFB, wykazano postępujący spadek gęstości neuronów w SN o 32.8% i 64.6% po 1 i 4 tygodniach od podania toksyny. Podobnie też zaobserwowano wczesną utratę fenotypu dopaminergicznego komórek i spadek ekspresji TH zanim doszło do faktycznej śmierci neuronów.

Po samym podaniu FC bezpośrednio do SN zaobserwowano niewielki spadek gęstości neuronów w 7 dniu. Natomiast gęstość neuronów nie dopaminergicznych nie obniżyła się. Nie wykazano też istotnej statystycznie zmiany po 4 tygodniach. Ponieważ neurony nie odradzają się w układzie czarnoprążkowiowym w tempie wystarczającym do repopulacji tkanki wnioskujemy, że nie doszło do znaczącego uszkodzenia neuronów a jedynie do ich przejściowego stresu i obniżonej ekspresji TH. Potwierdzają to też wyniki dotyczące ilości DA opisane poniżej.

Co ciekawe, uszkodzenie astrocytów równoczesne z podaniem 6-OHDA przyspieszyło ale nie nasiliło degeneracji neuronów dopaminergicznych w SN. Po 7 dniach gęstość neuronów była niższa po łącznym podaniu FC i 6-OHDA (39.2%) niż po samym 6-OHDA (spadek o 67.2%), natomiast po 4 tygodniach wielkość uszkodzenia nie różniła się istotnie statystycznie między obydwoma grupami (50.7% vs 41.8% odpowiednio FC+6OHDA vs 6-OHDA).

Wyniki powyższe potwierdziła też analiza Western blot ilości białka TH w SN.

Analiza HPLC również potwierdziła progresywną degenerację neuronów dopaminergicznych i wykazała, że selektywne uszkodzenie układu dopaminergicznego przez podanie 6-OHDA do MFB wywołało postępujący spadek poziomu DA w STR (o 74.6% i 93% odpowiednio po 7 dniach i 4 tygodniach) oraz w mniejszym stopniu w SN (o 37% i 79%). Obniżał się również poziom metabolitu DA, DOPAC. Co ciekawe, zaobserwowano również narastający obrót DA w STR (wzrost o 89.4% i 203.2% po 4 dniach i 4 tygodniach od operacji).

Samo podanie FC i uszkodzenie astrocytów wywołało przejściowe obniżenie ilości DA po 7 dniach w STR. Natomiast w SN obrót DA był nasilony, maskując ewentualne spadki DA. Efekty te były jedynie przejściowe i wróciły do poziomu kontroli po repopulacji astrocytów po 4 tygodniach od operacji.

Uszkodzenie równocześnie astrocytów i neuronów w SN nasiliło spadek DA i wzrost jej obrotu w STR po 7 dniach. Zmiany te zmniejszyły się po zakończeniu infuzji FC i okresie odstawienia. W SN znacząco podniesiony obrót DA maskował spadek ilości DA w 7 dniu. Po 4 tygodniach wielkość deficytu DA była jednakowa po samym 6-OHDA jak i po łącznym podaniu z FC. Wynik ten ponownie potwierdza wniosek, że uszkodzenie astrocytów przyspiesza ale nie nasila degeneracji neuronów a samo podanie FC jedynie stresuje neurony, nie zabijając ich.

Wykazanie, że uszkodzenie astrocytów blokuje funkcjonalną kompensację zaburzenia motorycznego

Dzięki opracowaniu przez nas wydłużonego a tym samym czulszego testu aktywności lokomotorycznej szczurów udało nam się dokładnie określić w czasie postępujące zmiany wywołane uszkodzeniem układu czarnoprążkowiowego, jego kompensacji oraz wpływ uszkodzenia astrocytów na obydwa powyższe procesy. Po podaniu toksyny selektywnie uszkadzającej neurony dopaminergiczne w 3 dniu po operacji widoczny był dramatyczny spadek aktywności lokomotorycznej w porównaniu do kontrolnych, również operowanych zwierząt. W następnych dniach (4 i 5) aktywność zwierząt stopniowo rosła aby w 7 dniu przewyższyć poziom kontrolny. Taki efekt superkompensacji opisaliśmy jako pierwsi. Po 4 tygodniach zaburzenia motoryczne zostały skompensowane i zwierzęta po 6-OHDA nie różniły się od kontrolnych. Z kolei uszkodzenie samych astrocytów wywołało jedynie niewielkie i przejściowe zaburzenie funkcji motorycznych zwierząt. Uszkodzenie astrocytów równoczesne z degeneracją neuronów zablokowało zarówno proces superkompensacji jak i długofalowej kompensacji i zwierzęta do 4 tygodni po operacji nie odzyskały pełni aktywności. Ten wynik bezsprzecznie dowodzi, że **wsparcie astrocytów jest niezbędne do procesu funkcjonalnej kompensacji zaburzeń motorycznych wywołanych postępującą degeneracją układu czarnoprążkowiowego.**

Podsumowanie: opisane przewlekłe podawanie niskiej dawki FC do SN stanowi dobry model długotrwałego uszkodzenia astrocytów. Sama, 7 dniowa dysfunkcja astrocytów nie wywołuje śmierci neuronów ale naraża je na przejściowy stres obniżając ekspresję TH, aktywność lokomotoryczną, aktywując mikroglej i zwiększając obrót DA. Natomiast uszkodzenie astrocytów podczas degeneracji neuronów dopaminergicznych blokuje proces kompensacji deficytów behawioralnych i przyspiesza ich degenerację. Potwierdza to istotną rolę ochronną astrocytów oraz ich ważną funkcję w procesie kompensacji. Zaburzenie funkcjonowania astrocytów może stanowić podstawę zwiększonej wrażliwości neuronów dopaminergicznych na urazy w trakcie życia i być przyczyną idopatycznej formy PD. Opracowany tutaj zwierzęcy model uszkodzenia astrocytów będzie bardzo przydatny do badania ochronnej roli astrocytów i poszukiwania astroprotektoryjnych terapii PD.

5] Określenie zmian w wykorzystaniu substratów energetycznych i ekspresji kluczowych białek regulujących metabolizm w szlaku czarnoprążkowiowym w odpowiedzi na uszkodzenie astrocytów i/lub neurodegenerację oraz skorelowanie zmian z możliwością kompensacji

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracy (Kuter et al. 2019).

Ponieważ jedną z ważniejszych funkcji astrocytów jest zapewnienie neuronom wsparcia energetycznego postanowiliśmy zbadać wpływ ich dysfunkcji na uszkodzenie układu czarnoprążkowiowego i na markery energetyki komórkowej, w tym różne substraty oraz białka kluczowe dla regulacji tych procesów. Badania przeprowadzono na tkankach tych samych zwierząt, które opisane były wcześniej przy opracowywaniu modelu uszkodzenia astrocytów i neuronów (Kuter et al. 2018a). Zaobserwowane zmiany dotyczące dostępności substratów energetycznych, glikolizy i cyklu Krebsa dotyczyły głównie grup, u których uszkodzone były astrocyty. Zmiany po podaniu FC były lokalne w SN i nie sięgały zakończeń w STR. Sama degeneracja neuronów dopaminergicznych nie wpłynęła zasadniczo na tę część metabolizmu energetycznego, natomiast widoczne były zmiany w łańcuchu oddechowym i SCx/Cx mitochondrialnych, co przedstawione zostało w punkcie 6.

Substraty i rezerwy energetyczne

Podstawowym substratem energetycznym dla komórek w mózgu, przede wszystkim neuronów jest glukoza. Astrocyty pokrywają swoimi wypustkami 97% naczyń krwionośnych i aktywnie wyłapują glukozę transportowaną do mózgu (Achanta & Rae 2017). W plazmie szczurów zaobserwowaliśmy spadek poziomu glukozy po uszkodzeniu astrocytów (Kuter et al. 2019). Ponieważ mózg jest organem, który proporcjonalnie zużywa najwięcej glukozy może to oznaczać zwiększone zapotrzebowanie CUN. Również wcześniejsze badania Hirose (2007) wykazały, że podanie FC do STR zwiększa wychwyt [¹⁸F]fluoro-deoksyglukozy.

Większość tkanek ssaków ma poza glukozą dodatkowe źródła energii i może je magazynować np. w formie tłuszczu ale nie mózg. Podstawową formą rezerw energetycznych mózgu jest glikogen. Gdy pojawiają się deficyty energetyczne syntezowane są ciała ketonowe (Achanta & Rae 2017). Zdolne do produkcji glikogenu i ciał ketonowych w mózgu są właśnie astrocyty, które również jako jedyne potrafią utleniać tłuszcze (Eraso-Pichot et al. 2018).

Glikogen stanowi formę magazynowania glukozy a jego zapasy wystarczają mózgowi jedynie na kilka minut funkcjonowania (Obel et al. 2012; Jakobsen et al. 2017; Hertz & Chen 2017). Neurony polegają na zasobach energetycznych otrzymywanych od astrocytów i udokumentowano, że rozkład glikogenu (glikogenoliza) jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania neuronów np. podczas procesów pamięciowych (Hertz & Chen 2017; Diemel & Cruz 2006). W naszych badaniach zaobserwowaliśmy znaczące spadki ilości glikogenu w SN po uszkodzeniu astrocytów (Kuter et al. 2019). Mogło to być wynikiem zarówno deficytu jego produkcji ze względu na zmniejszoną liczbę astrocytów jak i zwiększonego zapotrzebowania tkanki na wsparcie energetyczne dla zestresowanych neuronów. Pomimo regeneracji puli astrocytów w SN po 4 tygodniach ilość glikogenu w tej strukturze pozostawała nadal nieco obniżona, podobnie zresztą jak inne badane parametry energetyczne (mleczan, b-HB, aktywność akonitazy, ekspresja PDK2 i PGC-1 α), co może świadczyć o tym, że pomimo regeneracji nowo namnożone astrocyty nadal nie działały w pełni sprawnie energetycznie.

Ciała ketonowe są produkowane gdy występują deficyty glukozy i stanowią chętnie wykorzystywane przez neurony alternatywne źródło energii (Guzman & Blazquez 2004). Główną formą ciał ketonowych jest beta-hydroksymaślan (b-HB), poza mózgiem produkowany w największej ilości w wątrobie z kwasów tłuszczowych lub aminokwasów (Yudkoff *et al.* 1997) a w mózgu właśnie przez astrocyty. W naszych badaniach śmierć części astrocytów wywołała deficyt energetyczny i wzrost ilości b-HB w dopaminergicznych strukturach mózgu, zarówno SN jak i STR ale nie w plazmie. Oznacza to zwiększoną produkcję ciał ketonowych przez pozostałe przy życiu i zaktywowane astrocyty w mózgu (Kuter *et al.* 2019). Po regeneracji puli astrocytów po 4 tygodniach poziom b-HB wrócił do normy.

Mleczan jest kolejnym alternatywnym dla glukozy źródłem energii produkowanym cały czas przez astrocyty i dostarczany neuronom. Gdy brak jest glukozy mleczan od astrocytów wystarcza neuronom do funkcjonowania i jest wręcz preferowany przez neurony gdy zwiększają wyładowania (Bouzier-Sore & Pellerin 2013; Schurr & Payne 2007; Jha *et al.* 2012; Riske *et al.* 2017). W naszych badaniach uszkodzenie astrocytów powodowało spadek ilości dostępnego mleczanu w SN (Kuter *et al.* 2019), co potwierdza też wcześniejsze doniesienia po podaniach FC (Hassel *et al.* 1994; Hassel *et al.* 1995; Zielke *et al.* 2007; Rist *et al.* 1996).

Kwasy tłuszczowe w mózgu nie są magazynowane jako zapasy energetyczne ani w istotny sposób wykorzystywane jako źródło energii, pomimo, że ich utlenianie dostarcza więcej ATP niż glikoliza. Jedynymi komórkami zdolnymi do ich przetwarzania są astrocyty (Eraso-Pichot *et al.* 2018). Wiadomo również, że do produkcji ciał ketonowych wykorzystywany jest acetylo-CoA pochodzący z rozkładu kwasów tłuszczowych. Rodzina białek CPT1 (*carnitine palmitoyltransferase*, palmitylotransferaza karnitynowa) zawiera formę CPT1a zlokalizowaną w błonie mitochondrialnej astrocytów oraz formę CPT1c znajdującą się w retikulum endoplazmatycznym neuronów. CPT1a katalizuje kluczowy etap utleniania kwasów tłuszczowych poprzez ułatwianie ich transportu do wnętrza mitochondriów. Z kolei aktywność enzymatyczna CPT1c w neuronach nie została nigdy udowodniona (Lee & Wolfgang 2012) i uważa się, że pełni rolę czujnika przemian tłuszczu w neuronach (Casals *et al.* 2016). Co ciekawe, podniesiony poziom CPT1c zwiększa przeżywalność komórek w trakcie stresu metabolicznego (Zaugg *et al.* 2011; Casals *et al.* 2016). W naszych badaniach pokazaliśmy jako pierwsi, że po uszkodzeniu astrocytów w SN ekspresja zarówno neuronalnej CPT1c, jak i astrocytarnej formy CPT1a wzrosła (Kuter *et al.* 2019). **Ta obserwacja oraz podniesiony poziom ciał ketonowych w tkankach mózgu jest pierwszym tego typu doniesieniem pokazującym, że w trakcie stresu energetycznego kwasy tłuszczowe mogłyby być wykorzystywane przez astrocyty, jako alternatywne źródło energii. Wzrost ilości CPT1c w neuronach świadczy o ich adaptacji do uszkodzenia astrocytów i deficytu glukozy oraz mleczanu.**

Podsumowanie: Wykazano, że po przewlekłym uszkodzeniu astrocytów w SN występował lokalnie deficyt energetyczny, prawdopodobnie poprzez zmniejszenie zdolności astrocytów do wychwytywania glukozy z naczyń. Zaobserwowane zmiany w ilości substratów energetycznych i wzrost ekspresji białek CPT1 świadczą o przesunięciu źródeł energii opartych na glukozie w kierunku ciał ketonowych i kwasów tłuszczowych. Ciała ketonowe mogą stanowić dobre źródło kompensujące deficyty energetyczne w mózgu. Wyniki te potwierdzają zasadniczą rolę wspierającą energetykę neuronów przez astrocyty.

Rola kluczowych białek regulujących cykl Krebsa i energetykę komórkową

Zapotrzebowanie energetyczne komórek jest zaspokajane przez kilka uzupełniających się wzajemnie procesów. Ponieważ glukoza jest podstawowym źródłem energii w mózgu postanowiliśmy zbadać jak uszkodzenie astrocytów wpłynie na markery glikolizy i cyklu Krebsa. Tempo glikolizy w neuronach jest wolniejsze niż u astrocytów (Fernandez-Fernandez *et al.* 2012) co dodatkowo potwierdza centralną rolę astrocytów w gospodarce energetycznej mózgu.

Kinaza pirogronianowa M2 (*pyruvate kinase M2*, PKM2) reguluje końcowy, wyznaczający szybkość reakcji etap glikolizy przez katalizowanie wytwarzania pirogronianu i ATP (Yang & Lu 2015). PKM2 występuje tylko w astrocytach (Zhang *et al.* 2014) i reguluje zużycie glukozy w zależności od lokalnego stanu energetycznego komórki (Almeida *et al.* 2004; Tech *et al.* 2017). Skoro w naszych badaniach liczba astrocytów po infuzji FC spadła, a ilość tego selektywnie astrocytarnego białka nie

zmniejszyła się, świadczy to o jego nadekspresji w przeżywających astrocytach (Kuter *et al.* 2019). Potwierdza to też nasze wcześniejsze doniesienia o aktywacji pozostałych astrocytów.

Po syntezie pirogronianu przez PKM2 jego napływ do dalszych przemian kontrolowany jest przez enzym dehydrogenazę pirogronianową (*pyruvate dehydrogenase*, PDH) (Zhang *et al.* 2014). PDH to mitochondrialny kompleks enzymatyczny, który nieodwracalnie przekształca pirogronian w acetylo-CoA. Z kolei acetylo-CoA stanowi kluczowy substrat łączący glikolizę z cyklem Krebsa i z generowaniem ciał ketonowych oraz syntezą kwasów tłuszczowych (Jha *et al.* 2012). Dlatego PDH jest jednym z centralnych enzymów metabolizmu energetycznego w komórkach. Funkcjonowanie PDH regulowane jest przez enzym PDK2 (*pyruvate dehydrogenase kinase 2*, kinaza dehydrogenazy pirogronianowej 2), który obniża aktywność PDH przez fosforylację. Układ enzymatyczny PDH/PDK2 stanowi główny regulator aktywności energetycznej mitochondriów przełączając je z fosforylacji oksydatywnej na beztlenową glikolizę dzięki regulacji napływu substratów, pirogronianu i acetylo-CoA (Jha *et al.* 2012). W naszych badaniach po 7 dniowym uszkodzeniu astrocytów ekspresja PDK2 w SN była silnie obniżona. Efekt ten był nadal obserwowany po 4 tygodniach, chociaż w mniejszym stopniu (Kuter *et al.* 2019). Oznacza to silne odhamowanie PDH i prawdopodobne zwiększenie produkcji acetylo-CoA. Jest to zgodne z zaobserwowanym przez nas podniesionym poziomem b-HB i ekspresją CPT1a w astrocytach i potwierdza nasilenie metabolizmu tłuszczu po uszkodzeniu astrocytów i deficyt glukozy. Wiąże się to również z obniżonym poziomem mleczanu (Halim *et al.* 2010) pochodzącym z metabolizmu glukozy, zaobserwowanym również przez nas.

Kolejnym etapem metabolizmu energetycznego jest cykl Krebsa. Akonitaza mitochondrialna to jeden z pierwszych enzymów w tym cyklu przemian generujących ATP i NADPH. Zawiaduje reakcją przemiany cytrynianu w izocytrynian. Występuje w dużych ilościach w komórkach i jest o wiele wrażliwsza na dezaktywację niż forma cytozolowa (Li *et al.* 2001; Cantu *et al.* 2011; Tretter & Adam-Vizi 2000). W naszych badaniach infuzja FC i uszkodzenie astrocytów spowodowało bardzo silną aktywację tego enzymu w SN po 7 dniach od operacji. Po okresie odstawienia FC ten efekt był nadal nieco widoczny. Nie wykazaliśmy natomiast zmian w samej ilości tego białka (Kuter *et al.* 2019). Co istotne, selektywność działania FC opiera się po pierwsze na szybszym wychwycie toksyny przez transporter MCT1 w astrocytach niż przez inne komórki oraz na dużo wyższej aktywności właśnie akonitazy mitochondrialnej w astrocytach, która jest celem dezaktywowanym przez FC (Paulsen *et al.* 1987; Hassel *et al.* 1992; Hassel *et al.* 1994; Fonnum *et al.* 1997; Hirose *et al.* 2007; Zielke *et al.* 2007; Zielke *et al.* 2009). Wcześniejsze badania jednoznacznie wykazały, że w dawkach wyższych niż podawana przez nas FC hamował aktywność glejowej ale nie neuronalnej akonitazy (Hassel *et al.* 1995; Zielke *et al.* 2009; Paulsen *et al.* 1987; Hassel *et al.* 1992). Również w naszych badaniach potwierdziliśmy selektywność FC, który nie zabijał neuronów ani mikrogleju w SN (Kuter *et al.* 2018a). Z kolei, skoro doszło do uszkodzenia astrocytów przez podanie FC w naszych badaniach, musiał on hamować aktywność akonitazy. Potwierdza to również spadek GS, który również jest enzymem działającym poniżej akonitazy w astrocytach. W związku z tym, prawdopodobnie zaobserwowany wzrost aktywności akonitazy jest kompensacyjny w przeżywających aktywowanych astrocytach oraz prawdopodobnie innych komórkach, np. silnie aktywowanym mikrogleju i wynika z przewlekłego podawania niskiej dawki toksyny, do której układ ma czas się przystosować.

Białka utrzymujące homeostazę energetyczną i reagujące na potrzeby komórek

Białka takie jak AMPK (AMP-activated protein kinase catalytic subunit α) i PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α) zarządzają całością energetyki komórkowej. Należą one do grupy „energy sensing proteins” czyli białek wrażliwych na zmiany energetyczne. Kontrolują one zapotrzebowanie na różne substraty energetyczne i decydują o tym, które procesy są aktywowane, a które hamowane. Odpowiadają również na deficyty energetyczne i są bardzo ważne w procesach degeneracyjnych w mózgu. Homeostaza energetyczna w mózgu jest bezpośrednio związana z odpornością na różne formy stresu, uszkodzenia, starzenie i potencjał mózgu do kompensacji deficytów i adaptacji do zmieniających się warunków. Modulacja dostępności zasobów energetycznych a tym samym odporności mózgu stanowiłaby dobry punkt uchwytu terapeutycznego, zwłaszcza w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem.

Białko AMPK to swego rodzaju centrala zarządzania energetyką komórkową. Bezpośrednio reaguje ono na zmiany w proporcji AMP/ATP wyczuwając jaki jest status energetyczny komórki (Zaugg *et al.* 2011). Aktywowane jest przez fosforylację w odpowiedzi na zużywającą energię stres oksydacyjny i deficyty energetyczne, np. brak glukozy, tlenu, czy wysiłek fizyczny. AMPK wchodzi w interakcję z licznymi białkami fosforylując je i tym samym wpływając na ich aktywność a kolejno na ekspresje czynników transkrypcyjnych uruchamiających lub hamujących syntezę kluczowych białek dla energetyki komórkowej. W ten sposób komórka przeprogramowuje się i adaptuje do aktualnych potrzeb energetycznych. Aktywacja AMPK przeprogramowuje komórkę nasilając procesy kataboliczne generujące ATP (glikoliza, utlenianie tłuszczu, autofagia) oraz zmniejszając inne kosztowne procesy (synteza białek i tłuszczu) i oszczędzając tym samym energię. Dodatkowo AMPK monitoruje zapasy długoterminowe komórki, np. glikogen. Białkami, na które wpływa AMPK są m.in. PGC1 α oraz pośrednio CPT1c. AMPK również zarządza m.in produkcją ciał ketonowych i jego ekspresja jest trzykrotnie wyższa w astrocytach niż w neuronach (Blazquez *et al.* 1999). Aktywacja AMPK działa ochronnie na komórki (Guzman & Blazquez 2004). W modelach uszkodzenia neuronów dopaminergicznych za pomocą MPTP/MPP+ wykazano aktywację AMPK. W naszych obserwacjach tkanki po uszkodzeniu astrocytów widocznymi zmianami sugerującymi aktywację AMPK (wzrost ilości ciał ketonowych, spadek glukozy, wzrost ekspresji białek CPT1) natomiast analiza Western blot nie wykazała istotnych zmian w fosforylacji tego białka (pAMPK/AMPK) (Kuter *et al.* 2019). Możliwe, że odpowiada za to mieszanie się różnych efektów o przeciwnym wpływie na AMPK, np. spadek ilości astrocytów vs ich aktywacja oraz aktywacja mikrogleju. Różne komórki mają inne bazowe procesy uzyskiwania energii np. astrocyty są zasadniczo glikolityczne podczas gdy neurony i mikroglej wykorzystują w większym stopniu fosforylację oksydacyjną i łańcuch oddechowy. Z kolei aktywacja gleju zmienia stopień wykorzystania tych procesów i mikroglej staje się bardziej glikolityczny. Ta kwestia wymaga dalszych wyjaśnień.

PGC-1 α jest bezpośrednio regulowany przez fosforylację AMPK i odpowiada zasadniczo za oddychanie mitochondrialne, obronę przed ROS i metabolizm kwasów tłuszczowych, stanowiąc regulator biogenezy mitochondriów (Casals *et al.* 2016; Austin & St-Pierre 2012). Ulega ekspresji w największym stopniu w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu na tlen. W sytuacjach zwiększonego zapotrzebowania na energię PGC-1 α ulega aktywacji. Co ciekawe ekspresja PGC-1 α z wiekiem spada (Canto & Auwerx 2009). W naszych badaniach, pomimo braku aktywacji AMPK odnotowaliśmy silny wzrost ekspresji PGC-1 α w SN po przewlekłej infuzji FC (Kuter *et al.* 2019). To potwierdza nasze wnioski, że uszkodzenie astrocytów wywołuje lokalny deficyt energetyczny w układzie czarnoprążkowiowym i adaptacje w glikolizie oraz cyklu Krebsa.

Wpływ przewlekłego uszkodzenia astrocytów na metabolizm neuronów

Uszkodzenie selektywne samych neuronów dopaminergicznych nie wywołało zasadniczych zmian w poziomie substratów energetycznych, markerach glikolizy czy cyklu Krebsa. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami wskazującymi, że neurony do produkcji energii w większym stopniu wykorzystują łańcuch oddechowy i fosforylację oksydacyjną niż glikolizę.

Nasze badania udokumentowały, że uszkodzenie ok 30% astrocytów nie wywołuje śmierci neuronów dopaminergicznych a jedynie je przyspiesza. Przedstawione wyniki badań energetyki komórkowej potwierdzają to. Śmierć neuronów w niewielkim stopniu nasiliła efekty wywołane przez dysfunkcje astrocytów. Widoczne było zwiększenie spadku glikogenu i mleczanu w SN i glukozy w plazmie. Z kolei podniesiony poziom glikogenu i aktywność akonitazy w STR może świadczyć o próbach kompensacyjnej aktywacji zakończeń nerwowych. Co istotne przewlekła dysfunkcja astrocytów blokowała funkcjonalną kompensację deficytów motorycznych u zwierząt po lezjach układu czarnoprążkowiowego. Może to świadczyć o tym, że neurony pozbawione wsparcia energetycznego astrocytów nie są w stanie same zapewnić sobie wystarczających środków energetycznych aby wydajnie kompensować deficyty.

Podsumowanie: Przewlekłe uszkodzenie astrocytów wpływa w znacznym stopniu na glikolizę i cykl Krebsa w SN, natomiast selektywna degeneracja neuronów dopaminergicznych właściwie nie zmienia tych procesów. Prawdopodobna nadekspresja PKM2 w przeżywających astrocytach sugeruje nasiloną glikolizę. Odhamowanie PDH wskazuje na zwiększenie produkcji acetylo-CoA, co potwierdza

wzrost produkcji b-HB. Zwiększenie aktywności akonitazy również świadczy o nasileniu cyklu Krebsa w odpowiedzi na aktywację pozostałych przy życiu astrocytów aby utrzymać funkcjonowanie energetyczne SN. Brak zmian w fosforylacji AMPK wymaga wytłumaczenia i dalszych badań z podziałem na podtypy komórek (astrocyty vs neurony vs mikroglej). A silnie podniesiona ekspresja PGC-1 α wskazuje na biogenezę mitochondriów.

Przedstawione tutaj badania są pierwszą opublikowaną próbą scharakteryzowania przewlekłej dysfunkcji astrocytów *in vivo* i efektów jakie pojawiają się w metabolizmie energetycznym. Po raz pierwszy temat ten został podjęty również w obszarze układu czarnoprążkowiowego i w kontekście selektywnego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych, odpowiadających wczesnym fazom choroby Parkinsona oraz mechanizmów je kompensujących.

6] Określenie zmian w budowie i funkcjonowaniu kompleksów i superkompleksów oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach szlaku czarnoprążkowiowego w odpowiedzi na neurodegenerację i/lub uszkodzenie astrocytów oraz kompensacje uszkodzenia

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracy (Kuter et al. 2018b).

W odpowiedzi na uszkodzenie astrocytów największe zmiany zachodziły w metabolizmie glukozy, glikolizie i cyklu Krebsa oraz dochodziło do przesunięcia się dostępności do substratów energetycznych w stronę suplementacji ciałami ketonowymi i metabolizmem kwasów tłuszczowych. Natomiast w odpowiedzi na degenerację neuronów w układzie czarnoprążkowiowym zmianom ulegał łańcuch oddechowy i przemiany zależne od tlenu. Celem naszych badań było sprawdzenie jak układ czarnoprążkowiowy adaptuje się energetycznie do degeneracji ok 50% neuronów dopaminergicznych. Skoro pozostałe przy życiu neurony są w stanie funkcjonować na zwiększonym poziomie, utrzymując funkcjonowanie motoryczne na normalnym poziomie to prawdopodobnie mają one zwiększone zapotrzebowanie energetyczne. Aby sprawdzić tą teorię zbadaliśmy mitochondria pod kątem wydajności funkcjonowania i aktywności Cx oddechowych I i IV indywidualnych i wchodzących w skład SCx oraz aktywność, wydajność oraz ilości Cx II i jego substratu bursztynianu. Wykonaliśmy analizy zarówno poszczególnych form SCx i Cx, jak i badania całościowe na skrawkach tkanki (Cx II i IV). Ponieważ część naszych badań wskazywała na prawdopodobieństwo zwiększenia nie tyle wydajności funkcjonowania co samej ilości mitochondriów lub ich biogenezę (wzrost PGC-1 α) zbadaliśmy również markery ilościowe mitochondriów (VDAC, Cx V) i płynność ich błon (anizotropia fluorescencji).

Cx I i IV zwiększają wydajność funkcjonowania w odpowiedzi na selektywne uszkodzenie neuronów dopaminergicznych

Samo uszkodzenie ok 50% neuronów dopaminergicznych nie wywołało zasadniczych deficytów w metabolizmie energetycznym mitochondriów i markerach funkcjonowania łańcucha oddechowego. Wręcz przeciwnie, w komórkach, które pozostały przy życiu po uszkodzeniu 6-OHDA zaobserwowano wzrosty w parametrach opisujących funkcjonowanie Cx I i IV w SN. Wzrosły parametry dotyczące Cx I i Cx IV oraz Cx II i zawartość bursztynianu w SN. Zwiększyła się wydajność Cx I wewnątrz SCx I₁III₂ oraz I₁IV₁ po 7 dniach a po 4 tygodniach rosła aktywność enzymatyczna Cx I w SCx I₁III₂. Tendencje wzrostowe wykazano w aktywności enzymatycznej Cx IV wewnątrz wszystkich form SCx oraz w Cx IV₂ w 7 dni analizy (Kuter et al. 2018b). Potwierdza to obserwacje z naszych wcześniejszych badań gdzie wykazaliśmy również wzrost wydajności Cx I w SCx po 4 dniach od podania 6-OHDA do MFB (Kuter et al. 2016a).

Wyniki te potwierdzają naszą hipotezę, że proces kompensacji funkcjonalnej zwiększa zapotrzebowanie energetyczne neuronów pozostałych przy życiu i wskazuje na proces fosforylacji oksydatywnej a nie glikolizę czy cykl Krebsa, jako wykonawcę. Świadczy to o kompensacyjnym wzroście wydajności działania łańcucha oddechowego w celu utrzymania normalnej aktywności układu czarnoprążkowiowego pomimo częściowego uszkodzenia.

Wcześniejsze badania w tkankach mózgu pacjentów z PD wykazały spadki ilości Cx I i II na poziomie pojedynczej komórki (Grünewald et al. 2016). Wzrosty Cx I, II i IV zaobserwowane w naszych badaniach dotyczą modelu zwierzęcego, gdzie uszkodzenie wywołano za pomocą toksyny u zdrowych

skąd inąd zwierząt. Może to wskazywać, że procesy patologiczne specyficzne dla PD dotyczą właśnie funkcjonowania Cx i SCx oddechowych i spadek ich ilości zaburza procesy ochronne mózgu i prowadzi do degeneracji neuronów dopaminergicznych. Nasze badania pokazują również jednoznacznie, że neurony mogą być bardziej wrażliwe na deficyty w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym niż innych procesach generujących energię, jak glikoliza czy cykl Krebsa.

Uszkodzenie części neuronów dopaminergicznych zwiększa poziom bursztynianu w SN

Kolejnym ciekawym odkryciem tego cyklu prac było podniesienie się poziomu bursztynianu w SN po selektywnym uszkodzeniu części neuronów dopaminergicznych. Inne zbadane przez nas parametry dotyczące Cx II (wydajność, aktywność i ilość w żelach, wydajność reakcji na skrawkach tkanki, ilości białka SDHA należące do Cx II) wykazywały brak zmian lub konsekwentne, chociaż nie istotne statystycznie tendencje wzrostowe (Kuter *et al.* 2018b). Zinterpretowanie tego wyniku wymaga dalszych badań, niemniej jest bardzo interesujące z kilku powodów.

Bursztynian jest bezpośrednim substratem Cx II, który wchodzi w skład łańcucha oddechowego. Podczas gdy Cx I stanowi główny punkt wejścia elektronów do szlaku oksydatywnej fosforylacji, Cx II stanowi ich alternatywną furtkę. Co ciekawe, Cx II jest także enzymem należącym do cyklu Krebsa i łączy jego aktywność z funkcjonowaniem metabolizmu tlenowego. W markerach cyklu Krebsa nie znaleźliśmy jednak dowodów na to, że degeneracja samych neuronów zwiększałaby jego funkcjonowanie. Inną funkcją bursztynianu jest modyfikacja posttranslacyjna białek. Succynylacja jest istotna dla regulacji status energetycznego komórek i dopasowania ekspresji proteomu zaangażowanego w metabolizm glukozy i kwasów tłuszczowych do aktualnego zapotrzebowania komórki na ATP (Mills & O'Neill 2014). Również zwiększenie poziomu neurotransmitera GABA i mechanizm jego przesyłania między komórkami (GABA shunt) może wywołać zwiększenie ilości bursztynianu (Mills & O'Neill 2014). Degeneracja neuronów dopaminergicznych na pewno zaburza też funkcjonowanie neuronów postsynaptycznych a neurony GABA są liczne w SN i podniesiony poziom bursztynianu mógłby być tego odzwierciedleniem.

Wpływ uszkodzenia astrocytów na mitochondrialny łańcuch oddechowy

W naszym modelu badawczym uszkodzenie ok 30% astrocytów nasiliło glikolizę oraz cykl Krebsa a dostępność substratów energetycznych w tkance przesunęła się w stronę ciał ketonowych (Kuter *et al.* 2019). W kolejnych badaniach sprawdziliśmy wpływ uszkodzenia astrocytów na inny proces generowania ATP w komórkach, mitochondrialny łańcuch oddechowy i wykazaliśmy spadki w funkcjonowaniu Cx i SCx po podaniach FC. Po 7 dniach infuzji spadała wydajność funkcjonowania i ilość Cx I w SCx I₁III₂IV₁, oraz wydajność nie związanego w SCx Cx I₁, jak również wydajność i ilość Cx IV₁ oraz ilość SCx I₁III₂IV₂. Także ilość białka należące do Cx V (ATP5B) wykazała tendencje spadkowe. Po regeneracji astrocytów i wyciszeniu aktywacji mikrogleju (4 tygodnie) spadła również objętość mitochondriów mierzona ilością białka VDAC, ATP5B oraz pośrednio barwieniem Cx IV w tkance SN (Kuter *et al.* 2018b).

Co ciekawe, uszkodzenie astrocytów i aktywacja mikrogleju po 7 dniach korelowała ze wzrostem ilości białka SDHA, należącym do mitochondrialnego Cx II. Po odnowieniu się puli astrocytów, w 4-tym tygodniu, nadal widoczny był adaptacyjny wzrost wydajności i ilości Cx II w analizach prowadzonych na izolowanych mitochondriach (przeliczenia na 1 mg białka mitochondrialnego). Natomiast przez spadek ogólnej ilości mitochondriów w tkance funkcjonalność Cx II, ilość SDHA i bursztynianu spadła poniżej kontroli.

Jak wspomniano wyżej, Cx II integruje cykl Krebsa z oddychaniem mitochondrialnym i stanowi alternatywny punkt wejścia elektronów do łańcucha oddechowego. Nie jest on pompą protonową i nie tworzy SCx. Jego podjednostki są całkowicie kodowane przez jądrowe DNA, nie mitochondrialne (Cecchini 2003). Sugeruje się również, że Cx II stanowi mitochondrialny sensor pH inicjujący śmierć komórkową (Grimm 2013). Wzrost ilości białka należące do **Cx II potwierdza zaobserwowane przez nas wcześniej nasilenie funkcjonowania cyklu Krebsa. Po przewlekłym podaniu FC i uszkodzeniu astrocytów oraz aktywacji mikrogleju w SN dochodzi do przesunięcia w wykorzystaniu dostępnych procesów generujących energię w komórce z zahamowanej oksydacji fosforylacyjnej na glikolizę i cykl Krebsa.** Podjednostki białkowe Cx II mają najkrótszy czas półtrwania spośród Cx mitochondrialnych (Karunadharm *et al.* 2015) a sam Cx II w standardowych warunkach nie

funkcjonuje na najwyższych obrotach mając możliwość dostosowania swojej aktywności do potrzeb komórki, dzięki czemu jest ich dobrym markerem statusu energetycznego (Dröse 2013).

Wpływ uszkodzenia astrocytów na funkcjonowanie łańcucha oddechowego kompensujących neuronów

Zasadniczym celem naszych badań było sprawdzenie w jaki sposób uszkodzenie astrocytów może wpłynąć na proces degeneracji i kompensacji uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w SN. Otóż, uszkodzenie astrocytów nasiliło deficyty w niektórych markerach funkcjonowania łańcucha oddechowego. Po 7 dniach infuzji FC całkowita wydajność funkcjonowania Cx I oraz jego aktywność enzymatyczna w SCx I₁IV₁ spadła. Nasilił się też spadek barwienia Cx IV w tkance i ilość Cx IV w mitochondriach. Po 4 tygodniach od operacji, wydajność Cx I była nadal obniżona a jego aktywność spadła w dwóch formach SCx. Również wydajność i aktywność IV w izolowanych mitochondriach wykazała nasilone spadki po łącznym uszkodzeniu astrocytów i neuronów. Co istotne, zaobserwowane kompensacyjne wzrosty funkcjonowania Cx po uszkodzeniu samych neuronów dopaminergicznych (zwiększona wydajność Cx I w SCx, aktywność Cx IV₂ oraz podniesiony poziom bursztynianu) zostały zniwelowane przez równoczesne uszkodzenie astrocytów (Kuter *et al.* 2018b). **Neurony pozbawione wsparcia astrocytów nie były w stanie wydajnie zwiększyć energetyki komórkowej, tak aby skompensować deficyty na poziomie zachowania zwierząt. Dowodzi to, że wsparcie energetyczne astrocytów jest zasadniczym mechanizmem należącym do procesów kompensacyjnych w układzie czarnoprążkowiowym mózgu.**

Zmniejszenie sztywności błon mitochondrialnych koresponduje z funkcjonowaniem SCx oddechowych

Organizacja Cx oddechowych w SCx usprawnia ich funkcjonowanie (Schäfer *et al.* 2006; Genova & Lenaz 2014; Maranzana *et al.* 2013; Schon & Dencher 2009). Jak przedstawiono powyżej nasza hipoteza zakładała, że reorganizacja SCx mogłaby stanowić szybki sposób na dopasowanie wydajności produkcji energii bez angażowania kosztownej syntezy nowych białek (Kuter *et al.* 2016a). W naszych badaniach dotyczących jedynie degeneracji i kompensacji uszkodzenia neuronów dopaminergicznych wywołanych 6-OHDA udało nam się wykazać, że spadki w markerach funkcjonowania SCx i Cx korelowały ze zwiększoną płynnością błon mitochondrialnych (Kuter *et al.* 2016a). W kolejnych badaniach przeanalizowaliśmy dodatkowo wpływ uszkodzenia astrocytów na w/w proces. Nasze badania ponownie wykazały, że wzrost płynności błon mitochondrialnych korelował ze zmniejszonym funkcjonowaniem Cx oddechowych, bezpośrednio po łącznym uszkodzeniu astrocytów i neuronów (7 dni) oraz po uszkodzeniu samych astrocytów po 4 tygodniach (Kuter *et al.* 2018b). W neuronach Cx I występuje głównie w SCx, natomiast w samych astrocytach proporcja indywidualnego Cx I₁ jest większa, co wynika z większego wykorzystywania i wydajności fosforylacji oksydatywnej w neuronach niż astrocytach (Lopez-Fabuel *et al.* 2016). Zwiększenie płynności błon może świadczyć o wielu zachodzących tam procesach. Zarówno przesyłanie mitochondriów z ciała komórkowego do zakończeń, naprawa, reorganizacja, procesy typu fusion-fission czy biogeneza mogą wpływać na płynność błon.

Z innych badań wiadomo, że dendryty neuronów mają więcej przemieszczających się mitochondriów niż wypustki astrocytów (40% vs 15% – 20%). Również prędkość przemieszczania się mitochondriów są znacznie wolniejsze w komórkach glejowych (Jackson & Robinson 2017). Stąd zmieniająca się proporcja astrocytów względem neuronów w różnych grupach eksperymentalnych również może mieć istotne znaczenie dla interpretacji wyników dotyczących płynności błon mitochondrialnych.

Podsumowanie: wykazano, że neurony dopaminergiczne w SN, które przeżyły po podaniu 6-OHDA i kompensują funkcjonalne deficyty w zachowaniu motorycznym mają wyższe zapotrzebowanie na energię i zwiększają funkcjonowanie łańcucha oddechowego, w szczególności Cx I i IV oraz zwiększają ilość bursztynianu. Brak wsparcia energetycznego ze strony astrocytów nie pozwala neuronom na wydajną kompensację. Śmierć astrocytów w SN obniża funkcjonowanie łańcucha oddechowego i kompensacyjnie podnosi ilość Cx II łączącego oksydacyjną fosforylację z nasiloną glikolizą I cyklem Krebsa. Zmniejszona sztywność błon mitochondrialnych koresponduje z obniżoną wydajnością funkcjonowania SCx.

W cyklu przedstawionych prac opisano szczegółowo dwa wystandaryzowane modele zwierzęce i przebadano w nich ekspresje proteomu mitochondrialnego, liczne markery regulujące energetykę komórkową w procesach takich jak glikoliza, cykl Krebsa, mitochondrialny łańcuch oddechowy, skład i funkcjonowanie SCx, czy płynność błon mitochondrialnych. Nasze badania po raz pierwszy pokazują dowód na istotną rolę astrocytów w procesie kompensacji częściowego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w SN *in vivo*. Wykazano, że odpowiada za to m.in. wsparcie energetyczne ze strony astrocytów. Same neurony dopaminergiczne również ulegają adaptacji i kompensacyjnie zwiększają funkcjonowanie łańcucha oddechowego aby zaspokoić swoje zwiększone zapotrzebowanie energetyczne w uszkodzonym układzie czarnoprążkowiowym. Zaburzenie współpracy pomiędzy astrocytami a neuronami może leżeć u podłoża wrażliwości układu dopaminergicznego w patogenezie PD. Wsparcie energetyczne pozostałych przy życiu neuronów układu czarnoprążkowiowego oraz wzmocnienie funkcjonowania astrocytów mogą stanowić w przyszłości skuteczne podejście terapeutyczne zatrzymujące postęp neurodegeneracji w chorobach takich jak PD.

Skróty

6-OHDA – 6-hydroksydopamina
AMPK – AMP-activated protein kinase, catalytic subunit alpha
ATP5B - ATP synthase subunit beta
b-HB – beta-hydroxybutyrate, beta-hydroksymaślan
CP - n. caudatus i putamen, jądro ogoniaste i skorupa
CPT1a – carnitine palmitoyltransferase 1a – forma glejowa
CPT1c – carnitine palmitoyltransferase 1c – forma neuronalna
CUN - centralny układ nerwowy
Cx – kompleks oddechowy
DA – dopamina
DAT - transporter dopaminergiczny
DIGE – difference gel electrophoresis, różnicowa elektroforeza w żelu
DPYSL2 - dihydropyrimidinase-related protein 2
FC – fluorocytrynian
GFAP – glial fibrillary acidic protein, glejowe włókienkowe kwaśne białko
GS - glutamine synthetase, syntetaza glutaminy
MFB – medial forebrain bundle, pęczek włókien przyśrodkowych przodomózgowia
PD – choroba Parkinsona
PDK2 - pyruvate dehydrogenase kinase 2
PGC-1 α - peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α
PKM2 - pyruvate kinase M2
ROS – reactive oxygen species, wolne rodniki tlenowe
SCx – superkompleks
SDHA – succinate dehydrogenase subunit A
SN – substantia nigra, istota czarna
STR – striatum
TH – tyrosine hydroxylase, hydroksylaza tyrozynowa
VDAC - voltage-dependent anion channel 1
VTA - ventral tegmental area, pole brzusznej nakrywki

Referencje

- Achanta, L. B. and Rae, C. D. (2017) β -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochem Res* 42, 35-49.
- Acin-Perez, R. and Enriquez, J. A. (2014) The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 1837, 444-450.

- Almeida, A., Moncada, S. and Bolaños, J. P. (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 6, 45-51.
- Austin, S. and St-Pierre, J. (2012) PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125, 4963-4971.
- Benard, G. and Rossignol, R. (2008) Mitochondrial fluidity matters. Focus on "Inherited complex I deficiency is associated with faster protein diffusion in the matrix of moving mitochondria". *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C1123.
- Bezard, E. and Gross, C. E. (1998) Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55, 93-116.
- Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Cartlidge, N. E., Parker, W. D. and Turnbull, D. M. (1991) Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 104, 203-208.
- Blazquez, C., Woods, A., Guzman, M., de Ceballos, M. and Carling, D. (1999) The AMP-Activated Protein Kinase Is Involved in the Regulation of Ketone Body Production by Astrocytes.
- Bolaños, J. P. (2016) Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem*.
- Bouzier-Sore, A. K. and Pellerin, L. (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7, 179.
- Braak, H., Sastre, M. and Del Tredici, K. (2007) Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 114, 231-241.
- Buck, K. J., Walter, N. A. and Denmark, D. L. (2014) Genetic variability of respiratory complex abundance, organization and activity in mouse brain. *Genes Brain Behav* 13, 135-143.
- Canals, S., Larrosa, B., Pintor, J., Mena, M. A. and Herreras, O. (2008) Metabolic challenge to glia activates an adenosine-mediated safety mechanism that promotes neuronal survival by delaying the onset of spreading depression waves. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1835-1844.
- Canto, C. and Auwerx, J. (2009) PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20, 98-105.
- Cantu, D., Fulton, R. E., Drechsel, D. A. and Patel, M. (2011) Mitochondrial aconitase knockdown attenuates paraquat-induced dopaminergic cell death via decreased cellular metabolism and release of iron and H₂O₂. *J Neurochem* 118, 79-92.
- Casals, N., Zammit, V., Herrero, L., Fadó, R., Rodríguez-Rodríguez, R. and Serra, D. (2016) Carnitine palmitoyltransferase 1C: From cognition to cancer. *Prog Lipid Res* 61, 134-148.
- Cecchini, G. (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* 72, 77-109.
- Chochina, S. V., Avdulov, N. A., Igbavboa, U., Cleary, J. P., O'Hare, E. O. and Wood, W. G. (2001) Amyloid beta-peptide₁₋₄₀ increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region. *J Lipid Res* 42, 1292-1297.
- Chotibut, T., Davis, R. W., Arnold, J. C., Frenck, Z., Gurwara, S., Bondada, V., Geddes, J. W. and Salvatore, M. F. (2014) Ceftriaxone increases glutamate uptake and reduces striatal tyrosine hydroxylase loss in 6-OHDA Parkinson's model. *Mol Neurobiol* 49, 1282-1292.
- Chung, E. K., Chen, L. W., Chan, Y. S. and Yung, K. K. (2008) Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Comp Neurol* 511, 421-437.
- Clement, A. B., Gimpl, G. and Behl, C. (2010) Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic Biol Med* 48, 1236-1241.
- Corti, O. and Brice, A. (2013) Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 23, 100-108.
- Cui (2001) Inducible Ablation of Astrocytes Shows That These Cells Are Required for Neuronal Survival in the Adult Brain.
- de Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K. J., Penniston, J. T. et al. (2004) Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* 43, 169-175.
- Dienel, G. A. and Cruz, N. F. (2006) Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochem Int* 48, 586-595.
- Dobretsov, M. and Stimers, J. R. (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci* 10, 2373-2396.
- Dröse, S. (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1827, 578-587.

- Eckmann, J., Eckert, S. H., Leuner, K., Muller, W. E. and Eckert, G. P. (2013) Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 76-80.
- Emsley, J. G. and Macklis, J. D. (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* 2, 175-186.
- Eraso-Pichot, A., Brasó-Vives, M., Golbano, A., Menacho, C., Claro, E., Galea, E. and Masgrau, R. (2018) GSEA of mouse and human mitochondriomes reveals fatty acid oxidation in astrocytes. *Glia*.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I. and Díaz, M. (2011) Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* 17, 1107-1118.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A. and Bolaños, J. P. (2012) Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J* 443, 3-11.
- Finkelstein, D. I., Stanic, D., Parish, C. L., Tomas, D., Dickson, K. and Horne, M. K. (2000) Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 97, 99-112.
- Fonnum, F., Johnsen, A. and Hassel, B. (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21, 106-113.
- Fontana, A. C. (2015) Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem* 134, 982-1007.
- García, J. J., López-Pingarrón, L., Almeida-Souza, P. et al. (2014) Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res* 56, 225-237.
- García, J. J., Piñol-Ripoll, G., Martínez-Ballarín, E. et al. (2011) Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 32, 2045-2054.
- Genova, M. L. and Lenaz, G. (2013) A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria. *Biol Chem* 394, 631-639.
- Genova, M. L. and Lenaz, G. (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1837, 427-443.
- Grimm, S. (2013) Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1827, 565-572.
- Grünewald, A., Rygiel, K. A., Hepplewhite, P. D., Morris, C. M., Picard, M. and Turnbull, D. M. (2016) Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory Chain-Deficient Parkinson Disease Neurons. *Ann Neurol* 79, 366-378.
- Guzman, M. and Blazquez, C. (2004) Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 287-292.
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A. et al. (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58, 1168-1176.
- Hassel, B., Paulsen, R. E., Johnsen, A. and Fonnum, F. (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576, 120-124.
- Hassel, B., Sonnewald, U., Unsgård, G. and Fonnum, F. (1994) NMR spectroscopy of cultured astrocytes: effects of glutamine and the gliotoxin fluorocitrate. *J Neurochem* 62, 2187-2194.
- Hassel, B., Westergaard, N., Schousboe, A. and Fonnum, F. (1995) Metabolic differences between primary cultures of astrocytes and neurons from cerebellum and cerebral cortex. Effects of fluorocitrate. *Neurochem Res* 20, 413-420.
- Hattingen, E., Magerkurth, J., Pilatus, U., Mozer, A., Seifried, C., Steinmetz, H., Zanella, F. and Hilker, R. (2009) Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain* 132, 3285-3297.
- Hazelwood, L. A., Free, R. B., Cabrera, D. M., Skinbjerg, M. and Sibley, D. R. (2008) Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 283, 36441-36453.
- Henning, J., Strauss, U., Wree, A., Gimsa, J., Rolfs, A., Benecke, R. and Gimsa, U. (2008) Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 62, 246-253.
- Heo, S., Csaszar, E., Jung, G., Beuk, T., Höger, H. and Lubec, G. (2012) Hippocampal levels and activity of the sodium/potassium transporting ATPase subunit α -3 (AT1A3) are paralleling memory training in the multiple T-maze in the C57BL/6J mouse. *Neurochem Int* 61, 702-712.
- Hertz, L. and Chen, Y. (2017) Glycogenolysis, an astrocyte-specific reaction, is essential for both astrocytic and neuronal activities involved in learning. *Neuroscience*.
- Hirose, S., Umetani, Y., Amitani, M., Hosoi, R., Momosaki, S., Hatazawa, J., Gee, A. and Inoue, O. (2007) Role of NMDA receptors in the increase of glucose metabolism in the rat brain induced by fluorocitrate. *Neurosci Lett* 415, 259-263.

- Hol, E. M. and Pekny, M. (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32, 121-130.
- Hornykiewicz, O. (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51, S2-9.
- Hu, X., Yuan, Y., Wang, D. and Su, Z. (2016) Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res Bull* 125, 1-18.
- Jackson, J. G. and Robinson, M. B. (2017) Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia*.
- Jakobsen, E., Bak, L. K., Walls, A. B., Reuschlein, A. K., Schousboe, A. and Waagepetersen, H. S. (2017) Glycogen Shunt Activity and Glycolytic Supercompensation in Astrocytes May Be Distinctly Mediated via the Muscle Form of Glycogen Phosphorylase. *Neurochem Res*.
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M. B., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zöchling, R., Boissl, K. W. and Reichmann, H. (1994) Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 169, 126-128.
- Jha, M. K., Jeon, S. and Suk, K. (2012) Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders. *Curr Neuropharmacol* 10, 393-403.
- Jiménez, C. R., Stam, F. J., Li, K. W., Gouwenberg, Y., Hornshaw, M. P., De Winter, F., Verhaagen, J. and Smit, A. B. (2005) Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration. *Mol Cell Proteomics* 4, 120-132.
- Jyothi, H. J., Vidyadhara, D. J., Mahadevan, A., Philip, M., Parmar, S. K., Manohari, S. G., Shankar, S. K., Raju, T. R. and Alladi, P. A. (2015) Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiol Aging* 36, 3321-3333.
- Karunadharm, P. P., Basisty, N., Chiao, Y. A. et al. (2015) Respiratory chain protein turnover rates in mice are highly heterogeneous but strikingly conserved across tissues, ages, and treatments. *FASEB J* 29, 3582-3592.
- Kim, W. G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B. and Hong, J. S. (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20, 6309-6316.
- Kuter, K., Kratochwil, M., Berghauzen-Maciejewska, K., Głowacka, U., Sugawa, M. D., Ossowska, K. and Dencher, N. A. (2016a) Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1862, 741-753.
- Kuter, K., Kratochwil, M., Marx, S. H., Hartwig, S., Lehr, S., Sugawa, M. D. and Dencher, N. A. (2016b) Native DIGE proteomic analysis of mitochondria from substantia nigra and striatum during neuronal degeneration and its compensation in an animal model of early Parkinson's disease. *Arch Physiol Biochem*, 1-19.
- Kuter, K., Olech, Ł. and Głowacka, U. (2018a) Prolonged Dysfunction of Astrocytes and Activation of Microglia Accelerate Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Rat Substantia Nigra and Block Compensation of Early Motor Dysfunction Induced by 6-OHDA. *Mol Neurobiol* 55, 3049-3066.
- Kuter, K., Olech, Ł., Głowacka, U. and Paleczna, M. (2019) Astrocyte support is important for the compensatory potential of the nigrostriatal system neurons during early neurodegeneration. *J Neurochem* 148, 63-79.
- Kuter, K. Z., Olech, Ł. and Dencher, N. A. (2018b) Increased energetic demand supported by mitochondrial electron transfer chain and astrocyte assistance is essential to maintain the compensatory ability of the dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease. *Mitochondrion*.
- Kösel, S., Egensperger, R., von Eitzen, U., Mehraein, P. and Graeber, M. B. (1997) On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathol* 93, 105-108.
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N. et al. (2011) Reactive astrocytes and Wnt/beta-catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 41, 508-527.
- Lee, H. J., Kim, C. and Lee, S. J. (2010) Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev* 3, 283-287.
- Lee, H. S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A. et al. (2014) Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3343-3352.
- Lee, J. and Wolfgang, M. J. (2012) Metabolomic profiling reveals a role for CPT1c in neuronal oxidative metabolism. *BMC Biochem* 13, 23.
- Lessner, G., Schmitt, O., Haas, S. J., Mikkat, S., Kreutzer, M., Wree, A. and Glocker, M. O. (2010) Differential proteome of the striatum from hemiparkinsonian rats displays vivid structural remodeling processes. *J Proteome Res* 9, 4671-4687.

- Li, Patel, M. and Day, B. J. (2001) Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation.
- Liang, C. L., Wang, T. T., Luby-Phelps, K. and German, D. C. (2007) Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 203, 370-380.
- Lin, M. T. and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A. and Bolaños, J. P. (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 13063-13068.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Schapira, A. H. and Marsden, C. D. (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2), 333-342.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G. and Genova, M. L. (2013) Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal* 19, 1469-1480.
- Mills, E. and O'Neill, L. A. (2014) Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 24, 313-320.
- Nicolson, G. L. (2014) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* 1838, 1451-1466.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S. and Itohara, S. (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4037-4042.
- Obel, L. F., Muller, M. S., Walls, A. B., Sickmann, H. M., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S. and Schousboe, A. (2012) Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics* 4, 3.
- Ossowska, K. (1993) Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. *Pol J Pharmacol* 45, 109-131.
- Ossowska, K., Konieczny, J., Wardas, J., Pietraszek, M., Kuter, K., Wolfarth, S. and Pilc, A. (2007) An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats. *Amino Acids* 32, 179-188.
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M. J., Lévesque, M., Slack, R. S. and Trudeau, L. (2015) Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 25, 2349-2360.
- Paulsen, R. E., Contestabile, A., Villani, L. and Fonnum, F. (1987) An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism The Use of Fluorocitrate, *Journal of Neurochemistry* Volume 48, Issue 5. In: *Journal of Neurochemistry*, Vol. 48, pp. 1377-1385.
- Paulsen, R. E., Contestabile, A., Villani, L. and Fonnum, F. (1988) The effect of fluorocitrate on transmitter amino acid release from rat striatal slices. *Neurochem Res* 13, 637-641.
- Petzinger, G. M., Fisher, B., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., Nixon, K. and Jakowec, M. W. (2006) Behavioral motor recovery in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): changes in striatal dopamine and expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter proteins. *J Neurosci Res* 83, 332-347.
- Riske, L., Thomas, R. K., Baker, G. B. and Dursun, S. M. (2017) Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder. *Ther Adv Psychopharmacol* 7, 85-89.
- Rist, R. J., Romero, I. A., Chan, M. W. and Abbott, N. J. (1996) Effects of energy deprivation induced by fluorocitrate in immortalised rat brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 730, 87-94.
- Robinson, T. E., Mocsary, Z., Camp, D. M. and Wishaw, I. Q. (1994) Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 14, 2687-2696.
- Rodriguez Diaz, M., Alonso, T. J., Perdomo Diaz, J., Gonzalez Hernandez, T., Castro Fuentes, R., Sabate, M. and Garcia Dopico, J. (2005) Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia* 49, 134-142.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1990a) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54, 823-827.
- Schapira, A. H., Mann, V. M., Cooper, J. M., Dexter, D., Daniel, S. E., Jenner, P., Clark, J. B. and Marsden, C. D. (1990b) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55, 2142-2145.
- Schon, E. A. and Dencher, N. A. (2009) Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes. *Cell Metab* 9, 1-3.

- Schreiner, B., Romanelli, E., Liberski, P. et al. (2015) Astrocyte Depletion Impairs Redox Homeostasis and Triggers Neuronal Loss in the Adult CNS. *Cell Rep* 12, 1377-1384.
- Schurr, A. and Payne, R. S. (2007) Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 147, 613-619.
- Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A. and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370-15375.
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Mirick, G. E., Serhan, C. N. and Selkoe, D. J. (2003) Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem* 278, 49874-49881.
- Shrivastava, A. N., Redeker, V., Fritz, N. et al. (2015) α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J* 34, 2408-2423.
- Shults, C. W., Haas, R. H., Passov, D. and Beal, M. F. (1997) Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 42, 261-264.
- Stanic, D., Finkelstein, D. I., Bourke, D. W., Drago, J. and Horne, M. K. (2003a) Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *Eur J Neurosci* 18, 1175-1188.
- Stanic, D., Parish, C. L., Zhu, W. M., Krstew, E. V., Lawrence, A. J., Drago, J., Finkelstein, D. I. and Horne, M. K. (2003b) Changes in function and ultrastructure of striatal dopaminergic terminals that regenerate following partial lesions of the SNpc. *J Neurochem* 86, 329-343.
- Steffens, M. and Feuerstein, T. J. (2004) Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex--involvement of Na⁺/K⁺-ATPase. *Neurochem Int* 44, 529-538.
- Strömberg, I., Björklund, H., Dahl, D., Jonsson, G., Sundström, E. and Olson, L. (1986) Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 17, 225-236.
- Subramaniam, S. R. and Chesselet, M. F. (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 106-107, 17-32.
- Sugawa, M., Coper, H., Schulze, G., Yamashina, I., Krause, F. and Dencher, N. A. (1996) Impaired plasticity of neurons in aging. Biochemical, biophysical, and behavioral studies. *Ann N Y Acad Sci* 786, 274-282.
- Sun, F. and Cavalli, V. (2010) Neuroproteomics approaches to decipher neuronal regeneration and degeneration. *Mol Cell Proteomics* 9, 963-975.
- Takuma, K., Baba, A. and Matsuda, T. (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 72, 111-127.
- Tech, K., Tikunov, A. P., Farooq, H. et al. (2017) Pyruvate Kinase Inhibits Proliferation during Postnatal Cerebellar Neurogenesis and Suppresses Medulloblastoma Formation. *Cancer Res* 77, 3217-3230.
- Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci* 20, 8972-8979.
- Triplett, J. C., Swomley, A. M., Kirk, J. et al. (2016) Reaching Out to Send a Message: Proteins Associated with Neurite Outgrowth and Neurotransmission are Altered with Age in the Long-Lived Naked Mole-Rat. *Neurochem Res*.
- Wakabayashi, K., Hayashi, S., Yoshimoto, M., Kudo, H. and Takahashi, H. (2000) NACP/alpha-synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 99, 14-20.
- Werner, C. J., Heyny-von Haussen, R., Mall, G. and Wolf, S. (2008) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteome Sci* 6, 8.
- Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N. A. and Rommelspacher, H. (2010) 9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Rep* 62, 35-53.
- Witt, S. N. (2014) Lipid disequilibrium in biological membranes, a possible pathway to neurodegeneration. *Commun Integr Biol* 7, e993266.
- Yang, W. and Lu, Z. (2015) Pyruvate kinase M2 at a glance. *J Cell Sci* 128, 1655-1660.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I. and Grunstein, R. (1997) Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J Neurochem* 69, 682-692.
- Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P. T. et al. (2011) Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* 25, 1041-1051.

- Zhang, L. N., Li, J. X., Hao, L., Sun, Y. J., Xie, Y. H., Wu, S. M., Liu, L., Chen, X. L. and Gao, Z. B. (2013) Crosstalk between dopamine receptors and the Na⁺/K⁺-ATPase (review). *Mol Med Rep* 8, 1291-1299.
- Zhang, S., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Cline, M. A. and Gilbert, E. R. (2014) The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)* 11, 10.
- Zhao, C., Li, H., Zhao, X. J., Liu, Z. X., Zhou, P., Liu, Y. and Feng, M. J. (2016) Heat shock protein 60 affects behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease grafted with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived dopaminergic-like neurons. *Neurochem Res*.
- Zielke, H. R., Zielke, C. L. and Baab, P. J. (2009) Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *J Neurochem* 109 Suppl 1, 24-29.
- Zielke, H. R., Zielke, C. L., Baab, P. J. and Tildon, J. T. (2007) Effect of fluorocitrate on cerebral oxidation of lactate and glucose in freely moving rats. *J Neurochem* 101, 9-16.
- Zigmond, M. J. (1997) Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol Dis* 4, 247-253.
- Zigmond, M. J., Abercrombie, E. D., Berger, T. W., Grace, A. A. and Stricker, E. M. (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* 13, 290-296.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A) Osiągnięcia naukowe przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Prowadzone przeze mnie wcześniejsze prace badawcze skupiały się wokół funkcjonowania układów dopaminergicznego mózgu, choroby Parkinsona, przyczyn jej powstawania, modelowania objawów i patogenezы tej choroby u zwierząt, poszukiwania środków neuroprotektoryjnych, a także badania zaburzeń współwystępujących lub pokrewnych z chorobą Parkinsona.

Badania nad wpływem pestycydu parakwat na mózg

Pestycyd parakwat zwiększa prawdopodobieństwo zapadalności na chorobę Parkinsona. Badania nad wpływem pestycydu parakwat na mózg i możliwość wywoływania objawów podobnych do choroby Parkinsona u zwierząt z jego wykorzystaniem rozpoczęłam wraz z pierwszą pracą zawodową w IF PAN oraz po kilku miesiącach z doktoratem. Część prac z tego cyklu opublikowana w latach 2005-2007 włączona została do pracy doktorskiej (Ossowska *et al.* 2005ab, Ossowska *et al.* 2006, Kuter *et al.* 2007). W cyklu łącznie 7 prac wykazaliśmy, że:

- Parakwat podawany przewlekłe jeden raz w tygodniu przez 6 miesięcy wywoływał wolno postępującą degenerację neuronów układu czarnoprążkowiowego oraz mezokortykalnego u szczurów.
- Postępującą degenerację poprzedził etap kompensacyjnego nasilenia transmisji dopaminergicznej.
- Badania mikrodializacyjne mózgu szczura wykazały, że podania niskiej dawki parakwatu generują powstawanie wolnych rodników tlenowych zarówno w mózgu jak i tkankach obwodowych, oraz, że podanie parakwatu przejściowo podnosi uwalnianie dopaminy.
- Jednorazowe podanie parakwatu dootrzewnowo wywołało przejściowe zmiany w wiązaniu liganda do transportera DAT. Jest to dodatkowe potwierdzenie wpływu parakwatu na funkcjonowanie układu czarnoprążkowiowego, nawet po jednorazowej ekspozycji.
- Subchroniczne, 5-ciodniowe dootrzewnowe podania parakwatu są bardziej toksyczne dla zwierząt eksperymentalnych niż podania raz na tydzień wyższej dawki. Przebadano zmiany wywołane w układzie czarnoprążkowiowym w dwóch punktach czasowych wykazując dynamiczne zmiany zachodzące zarówno w transmisji dopaminergicznej, serotonergicznej, noradrenergicznej jak i GABAergicznej. Subchroniczna ekspozycja na stres oksydacyjny jest toksyczna względem neuronów dopaminergicznych i zaburza funkcjonowanie wielu systemów neuronalnych, wywołując zarówno degenerację jak i kompensację.
- Białka GSK-3β i jej aktywna forma ufosforylowana przy tyrozynie 216 (pY216) w sposób różnicowany zmieniało ekspresję w poszczególnych frakcjach komórkowych pobranych ze struktur

takich jak śródmózgowie z mostem, prążkowie, hipokamp, mózdzek, wskazując, że różne komórki w odmienny sposób reagują na podawany obwodowo przez 37 tygodni paraquat w niskiej dawce, co pośrednio świadczyć może o zwiększonej wrażliwości akurat neuronów dopaminergicznych na paraquat.

Ossowska K, Wardas J, Smałowska M, Kuter K, Lenda T, Wierońska JM, Zieba B, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, Kwieciński A, Wolfarth S. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci*. 2005 Sep;22(6):1294-304.

Ossowska K, Smałowska M, Kuter K, Wierońska J, Zieba B, Wardas J, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, Biedka I, Schulze G, Rommelspacher H. Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):2155-65.

Kuter K, Nowak P, Gołombiowska K, Ossowska K. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats. A comparison with peripheral tissues. *Neurochem Res*. 2010 Aug;35(8):1121-30.

Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, Labus Ł, Kwieciński A, Krygowska-Wajs A, Wolfarth Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacol Rep*. 2005 May-Jun;57(3):330-5.

Kuter K, Smałowska M, Wierońska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, Nowak P, Biedka I, Rocznik W, Konieczny J, Wolfarth S, Ossowska K. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res*. 2007 Jun 25;1155:196-207.

Songin M, Ossowska K, Kuter K, Strosznajder JB. Alteration of GSK-3 β in the hippocampus and other brain structures after chronic paraquat administration in rats. *Folia Neuropathol*. 2011;49(4):319-27.

Songin M, Strosznajder JB, Fitał M, Kuter K, Kolasiewicz W, Nowak P, Ossowska K. Glycogen synthase kinase 3 β and its phosphorylated form (Y216) in the paraquat-induced model of parkinsonism. *Neurotox Res*. 2011 Jan;19(1):162-71.

Depresja w chorobie Parkinsona

Depresja jest częstym objawem współwystępującym z chorobą Parkinsona a często ją wyprzedzającą. Badania nad współwystępowaniem objawów depresyjnych z wczesnymi etapami depresji opublikowano w cyklu trzech prac. Wykazaliśmy co następuje:

- Niewielkie, częściowe uszkodzenie układu czarnoprążkowiego, a zwłaszcza brzuszno-prążkowiego wywołuje zmiany typu depresyjnego w zachowaniu zwierząt, bez wywoływania zaburzeń motorycznych i może być z powodzeniem wykorzystywane, jako zwierzęcy model do dalszych badań patomechanizmów depresji jako prodromalnego objawu choroby Parkinsona i jego potencjalnej farmakoterapii.
- Zestawiono efektywność działania znanych leków antydepresyjnych imipraminy, fluoksetyny i pramipeksolu i wykazano, że tylko chroniczne podawanie pramipeksolu zmniejszało objawy depresyjne u zwierząt w opisanym wcześniej modelu.
- Efektywność przewlekłego podawania pramipeksolu na zmniejszenie objawów depresyjnych wywołanych niewielkim uszkodzeniem układu czarnoprążkowiego, mogła polegać na było

wywołaniu zmian w ekspresji mRNA czynnika troficznego BDNF oraz jego receptora trkB w strukturach limbicznych mózgu szczura, takich jak VTA, prążkowi, jądrze ogoniastym, amygdali..

Kuter K, Kolasiewicz W, Gołombiowska K, Dziubina A, Schulze G, Berghauzen K, Wardas J, Ossowska K. Partial lesion of the dopaminergic innervation of the ventral striatum induces "depressive-like" behavior in rats. *Pharmacol Rep*. 2011 Nov;63(6):1383-92.

Berghauzen-Maciejewska K, Kuter K, Kolasiewicz W, Głowacka U, Dziubina A, Ossowska K, Wardas J. Pramipexole but not imipramine or fluoxetine reverses the "depressive-like" behaviour in a rat model of preclinical stages of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2014 Sep 1;271:343-53

Berghauzen-Maciejewska K, Wardas J, Kosmowska B, Głowacka U, Kuter K, Ossowska K. Alterations of BDNF and trkB mRNA expression in the 6-hydroxydopamine-induced model of preclinical stages of Parkinson's disease: an influence of chronic pramipexole in rats. *PLoS One*. 2015 Mar 4;10(3):e0117698.

Dyskinezy

Dyskinezy stanowią najczęstszy skutek uboczny długotrwałego stosowania L-DOPY w przebiegu leczenia objawowego choroby Parkinsona i w drastyczny sposób dodatkowo upośledzają funkcjonowanie pacjentów. Poniższa praca opublikowana przez prof. Cenci i współpracowników była moją pierwszą opublikowaną pracą powstałą w wyniku wyjazdu stypendialnego do Lund w Szwecji. Na mikromacierzach przeprowadzono analizę ekspresji 8000 fragmentów mRNA izolowanego z prążkowi w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona i dyskinez wywołanych L-DOPA. Zestawiono ekspresje mRNA u zwierząt, u których wystąpiły dyskinezy ze zwierzętami na nie odpornymi aby wyodrębnić ścieżki molekularne zaangażowane w mechanizmy ich powstawania. Wykazano m.in. aktywację neuronów GABAergicznych, zmiany w sygnalizacji i homeostazie wapniowej, wzrost plastyczności strukturalnej, i aktywację transkrypcyjną oraz synaptyczną, zmniejszoną możliwość produkcji energii i syntezy białek rybosomalnych.

Konradi C, Westin JE, Carta M, Eaton ME, Kuter K, Dekundy A, Lundblad M, Cenci MA. Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*. 2004 Nov;17(2):219-36.

Badania nad drżeniami wywołanymi harmaliną

Jednym z objawów choroby Parkinsona są drżenia spoczynkowe. Są one trudne do leczenia a ich mechanizm powstawania nieznany. Brak modeli do badania drżeń typu parkinsonowskiego. Pokrewnym zaburzeniem są drżenia samoistne a modelować je można przy użyciu harmaliny. Część mechanizmów wywoływania tych typów drżeń może być zbliżona. Stąd seria badań nad próbą połączenia modelu choroby Parkinsona i uszkodzenia układu dopaminergicznego z wywoływaniem drżeń harmaliną oraz prób farmakologicznego ich wyciszenia. W tych badaniach wykazano:

- Samo podanie harmaliny u szczurów i wywołane przez nią drżenia są dawko-zależnie nasilane przez selektywnego antagonistę receptorów metabotropowych grupy 1mGluR1, JNJ 16259685. Wynik ten sugeruje, że działanie harmaliny może w części wynikać z jej hamowania aktywności receptora mGluR1.
- Uszkodzenie transmisji dopaminergicznej w mózdku łącznie z uszkodzeniem transmisji noradrenergicznej nasilało drżenia wywołane harmaliną, co wiązało się z jednoczesną aktywacją transmisji serotonergicznej w prążkowi i korze czołowej. Uszkodzenie samych zakończeń dopaminergicznych w mózdku nie wpłynęło na drżenia. Świadczy to o istotnej roli unerwienia noradrenergicznego w mózdku i jego hamującemu działaniu na drżenia wywołane harmaliną.
- Z kolei uszkodzenie neuronów dopaminergicznych w polach A8 i A9 nasilało drżenia wywołane harmaliną ale nie zmieniało ich charakteru. Wykazano też różnego typu korelacje pomiędzy

intensywnością drżeń a poziomem i obrotem DA w prążkowie i mózdzku oraz poziomem i obrotem serotoniny w mózdzku. Wyniki wskazują, że uszkodzenie również pola A8 może mieć wpływ na drżenia generowane przez mózdzek.

- Drżenie harmalinowe generowane jest przez projekcję glutaminianergiczną oliwkowo-mózdkową a jej powtarzane podanie wywołało spadek ekspresji mRNA dla receptora glutaminianergicznego mGluR4 właśnie w oliwce i mózdzku. Wykazano, że obwodowe podanie pozytywnego modulatora allosterycznego receptora glutaminianu mGluR4, Lu AF21934 zniósło hyperaktywność wywoływaną przez jednorazowe podanie harmaliny ale nie wpłynęło na drżenia. Zatem receptor mGluR4 może odgrywać istotną rolę w regulację motoryki przez mózdzek ale najprawdopodobniej nie odgrywa on znaczącej roli w generowaniu drżeń.

Kolasiewicz W, Kuter K, Wardas J, Ossowska K. Role of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 in the harmaline-induced tremor in rats. *J Neural Transm.* 2009 Sep;116(9):1059-63.

Kolasiewicz W, Kuter K, Nowak P, Pastuszka A, Ossowska K. Lesion of the Cerebellar Noradrenergic Innervation Enhances the Harmaline-Induced Tremor in Rats. *Cerebellum.* 2011 Jun;10(2):267-80.

Kolasiewicz W, Kuter K, Berghauzen K, Nowak P, Schulze G, Ossowska K. 6-OHDA injections into A8-A9 dopaminergic neurons modelling early stages of Parkinson's disease increase the harmaline-induced tremor in rats. *Brain Res.* 2012 Oct 5;1477:59-73.

Ossowska K, Wardas J, Berghauzen-Maciejewska K, Głowacka U, Kuter K, Pilc A, Zorn SH, Doller D. Lu AF21934, a positive allosteric modulator of mGlu4 receptors, reduces the harmaline-induced hyperactivity but not tremor in rats. *Neuropharmacology.* 2014 Aug;83:28-35.

Metabotropowe receptory glutaminianu jako potencjalna terapia akinezy

Potencjalna terapia choroby Parkinsona ligandami hamującymi receptory metabotropowe glutaminianu przez wiele lat dawała wiele nadziei i prowadzono liczne badania w modelach zwierzęcych choroby nad możliwościami ich zastosowania do modulacji funkcjonowania uszkodzonego układu czarnoprążkowiego i układów postsynaptycznych.

- Wynikiem tych prac była praca przeglądowa Ossowska *et al.* 2007, wskazująca, że antagoniści I grupy receptorów mGlu lub agoniści grupy III działają w pożądanym sposób na objawy typu parkinsonowskiego w różnych modelach doświadczalnych. Wskazano również, że ścieżka striatopallidalna mogłaby być dobrym celem dla farmakoterapii choroby Parkinsona ligandami receptorów mGlu.
- W drugiej z publikacji (Konieczny *et al.* 2007) wykazano, że agonista grupy II mGluR ACPT-1 podany do gałki bladej, prążkowie lub substancji czarnej części siateczkowatej dawko-zależnie hamował katalepsję wywołaną haloperidolem u szczurów. Wykazano również, że podanie ACPT-1 normalizowało zwiększoną ekspresję mRNA proenkefaliny. Najlepszym z badanych celów okazała się gałka blade przed prążkowie i istota czarna częścią siateczkowatą.

Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Pietraszek M, Kuter K, Wolfarth S, Pilc A. An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats. *Amino Acids.* 2007 Feb;32(2):179-88.

Konieczny J, Wardas J, Kuter K, Pilc A, Ossowska K. The influence of group III metabotropic glutamate receptor stimulation by (1S,3R,4S)-1-aminocyclo-pentane-1,3,4-tricarboxylic acid on the parkinsonian-like akinesia and striatal proenkephalin and prodynorphin mRNA expression in rats. *Neuroscience.* 2007 Mar 16;145(2):611-20.

Badania nad beta-karbolinami

Od momentu wykazania, że toksyna MPTP wywołuje parkinsonizm u ludzi rozpoczęto szeroko zakrojone badania nad substancjami o podobnej budowie chemicznej, m.in. beta-karbolinami. Powstają one z tryptofanu i mogą występować endogennie w organizmie. W Zakładzie Neuropsychologii oraz współpracującym z nami wówczas Zakładem neurobiologii Klicznej, Charité – Universitätsmedizin w Berlinie prowadzono liczne badania nad różnymi formami beta-karbolin, zarówno nad ich toksycznością, jak i możliwością wykorzystania do neuroprotekcji. W dwóch z tych prac wykazano:

- Donigralne podanie jonu 2,9-dimetyl-beta-karbolinowego zwiększało napięcie mięśniowe i aktywność elektromiograficzną, wywoływało degeneracje neuronów dopaminergicznych w SN i obniżało metabolizm dopaminy. W ten sposób wykazano toksyczność metylowanej beta-karboliny wywołującą objawy podobne do parkinsonowskich.
- Z kolei inna beta-karbolina 9-metyl-beta-karbolina wykazywała działanie ochronne na neurony dopaminergiczne w modelu toksyczności wywołanej MPP+ *in vivo*. Jej podanie w minipompkach osmotycznych dokomorowo działało neuroprotekcynie na neurony dopaminergiczne w SN, odwracało deficyty w poziomie dopaminy wywołane przez MPP+, oraz deficyty w aktywności mitochondrialnego Cx I (2-D BN/PAGE i MS Maldi-TOF). Badania na mikromacierzach wykazały wzrost ekspresji neurotrofin BDNF, CDNF, CNTF i prekursorowego białka cerebelliny 1.

Lorenc-Koci E, Rommelspacher H, Schulze G, Wernicke C, Kuter K, Śmiałowska M, Wierońska J, Zieba B, Ossowska. Parkinson's disease-like syndrome in rats induced by 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion, a beta-carboline occurring in the human brain. *Behav Pharmacol.* 2006 Sep;17(5-6):463-73.

Wernicke C, Hellmann J, Zieba B, Kuter K, Ossowska K, Frenzel M, Dencher NA, Rommelspacher H. 9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 2010 Jan-Feb;62(1):35-53.

Zahamowanie aktywności proteasomu

Do znanych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę choroby Parkinsona należy zahamowanie funkcji proteasomu i agregacja białek, w tym α -synukleiny. Stąd próba wykorzystania tego mechanizmu do stworzenia nowego modelu zwierzęcego choroby Parkinsona. Badania opisane w pracy Konieczny et al. 2014 próbowały wykazać ochronną funkcję celastrolu względem śmierci komórek wywołanych zahamowaniem aktywności proteasomu przez laktacystynę, jednak bezskutecznie. Wykazano, że celastrol podawany obwodowo w różnych dawkach nie chronił, lub wręcz nasilał degenerację neuronów dopaminergicznych wywołaną laktacystyną u szczurów. Podobnie w badaniach *in vitro* na pierwotnych hodowlach neuronalnych kory oraz w liniach komórkowych neuroblastomy SH-SY5Y również nie wykazano efektu ochronnego a wręcz dawko-zależne nasilenie toksyczności.

Konieczny J, Jantas D, Lenda T, Domin H, Czarnecka A, Kuter K, Śmiałowska M, Lasoń W, Lorenc-Koci E. Lack of Neuroprotective Effect of Celastrol Under Conditions of Proteasome Inhibition by Lactacystin in In Vitro and In Vivo Studies: Implications for Parkinson's Disease. *Neurotox Res.* 2014 Oct;26(3):255-73.

Inne

We współpracy z Zakładem Neurologii, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego zebrano tkanki od 22 pacjentów kontrolnych w różnym wieku oraz od 2 osób z chorobą Parkinsona. Zestawienie preparatów diagnostycznych *post mortem* wykazało wzrost ilości ciał Marinesco w istocie czarnej korespondujący z wiekiem, podobnie jak wzrost ekspresji synfiliny-1 oraz spadek TH.

Krygowska-Wajs A, Lenda T, Adamek D, Moskała M, Kuter K, Kunz J, Śmiałowska M, Ossowska K. Increased synphilin-1 expression in human elderly brains with substantia nigra Marinesco bodies. *Pharmacol Rep.* 2008 Nov-Dec;60(6):914-24.

We współpracy z Pracownią Neurobiologii Pierwiastków Śladowych, Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie wykazano wpływ chronicznej suplementacji cynku na ekspresję mRNA i białka receptora serotoninowego 5-HT1A i wykazano jego wzrost w hipokampie i podniesienie się poziomu i obrotu serotoniny. Wykazano również wpływ na poziom i obrót DA w korze przedczołowej. Wyniki te w kontekście wcześniejszych badań nad objawami depresji wskazują, na zaangażowanie cynku w modulowanie efektów farmakoterapii depresji przy pomocy ligandów receptora 5-HT1A oraz na rolę układu dopaminergicznego.

Bernadeta Szewczyk, Katarzyna Kotarska, Agata Siwek, Łukasz Olech, Katarzyna Kuter Antidepressant activity of zinc: Further evidence for the involvement of the serotonergic system. *Pharmacol Rep.* 2017 Jan 19;69(3):456-461.

We współpracy z prof. Przemysławem Nowakiem ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego wykazano, że:

- Ekspozycja na fluor w dorosłości może wpływać na wychwyt glukozy w tkankach mózgu i obwodowych u szczura.
- Uszkodzenie układu noradrenergicznego u noworodków obniża przeciwbólowy efekt agonisty receptora kanabinoidowego CB1, metanandamidu, nie zmieniając równocześnie ekspresji samego receptora w mózgu. Układ noradrenergiczny odgrywa istotną rolę w procesach bólowych mediowanych przez CB1.

Rogalska, Katarzyna Kuter, Aleksandra Żelazko, Anna Głogowska-Gruszka, Elżbieta Świętochowska, Przemysław Nowak. Fluoride Alteration of [3H]Glucose Uptake in Wistar Rat Brain and Peripheral Tissues. *Neurotox Res.* 2017 Apr;31(3):436-443.

Korossy-Mruk E, Kuter K, Nowak P, Szkilnik R, Rykaczewska-Czerwinska M, Kostrzewa R, Brus R. Neonatal DSP-4 Treatment Modifies Antinociceptive Effects of the CB(1) Receptor Agonist Methanandamide in Adult Rats. *Neurotox Res.* 2013 Jan;23(1):39-48.

B) Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą

Współprace po doktoracie:

- Prof. Martin Schwab - Institute of Regenerative Medicine (IREM), University of Zurich and Dept. of Health Sciences and Technology, ETH, Zurich, Szwajcaria.
Temat: Przeciwciała neutralizujące czynnik Nogo-A, hamujący rozrost neuronów, jako potencjalna terapia regeneracyjna w chorobie Parkinsona. Badania w modelu zwierzęcym 6-OHDA.
Współpraca rozpoczęta w 2019r.
- Dr Monika Marcinkowska – Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
Temat: Wpływ agonisty receptora GABA α 1 na objawy motoryczne zwierząt w modelach drżeń samoistnych oraz choroby Parkinsona.
Współpraca rozpoczęta w 2018r.
- Prof. Norbert A Dencher - Physical Biochemistry, Department of Chemistry, Technische Universität Darmstadt, Niemcy.

Temat: Skład i aktywność superkompleksów mitochondrialnych fosforylacji oksydacyjnej w modelu uszkodzenia neuronów dopaminergicznych oraz dysfunkcji astrocytów i kompensacji deficytów.

4 wspólne publikacja.

▪ Prof. Stephan Lehr i dr Sonja Hartwig - Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, German Diabetes Center at the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Leibniz Center for Diabetes Research, Düsseldorf, Niemcy.

Temat: Identyfikacja proteomu błon mitochondrialnych zmieniającego się w procesie degeneracji układu czarnoprążkowiowego u szczura.

1 wspólna publikacja.

▪ Prof. Carsten Culmsee i dr Goutham Ganjam - Philipps Universität Marburg, Niemcy

Temat: Wpływ modyfikacji genetycznej czynnika AIF na aktywność i skład superkompleksów mitochondrialnych.

▪ Dr hab. Amalia Dolga - University of Groningen, Holandia

Temat: Aktywność i skład superkompleksów mitochondrialnych w zwierzęcym modelu epilepsji.

Manuskrypt w opracowaniu.

▪ Dr hab. Berta Szewczyk – Pracownia Neurobiologii Pierwiastków Śladowych, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie.

Temat: Poziom i metabolizm serotoniny po jednorazowych i przewlekłych podaniach cynku. Analiza HPLC.

1 wspólna publikacja.

Współprace przed doktorem:

▪ Prof. Przemysław Nowak – Zakład Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze. Później Katedra Toksykologii i Ochrony Zdrowia, Szkoła Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny.

Temat: Analiza HPLC poziomu wolnych rodników i neuroprzebiegów oraz ich metabolizmu w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona wywołanych pestycydami.

Temat: Rola układu noradrenergicznego w powstawaniu drżeń samoistnych i działaniu przeciwbólowym agonisty receptora CB1.

10 wspólnych publikacji.

▪ Prof. Hans Rommelspacher i dr Gert Schulze - Sektion Klinische Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin w Berlinie

Temat: Zwierzęce modele choroby Parkinsona wywołane pestycydami oraz mechanizmy działania beta-karbolin.

5 wspólnych publikacji.

▪ Prof. Joanna Strosznajder - Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mossakowskiego, PAN, Warszawa.

Temat: Rola GSK3beta w zwierzęcym modelu degeneracji neuronów dopaminergicznych wywołanych pestycydami.

2 wspólne publikacje.

▪ Prof. Anna Krygowska-Wajs – Zakład Neurologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Temat: Zmiany patologiczne związane z agregacją synfiliny-1 lub α -synukleiny w mózgach ludzkich i zwierzęcym modelu choroby Parkinsona wywołanej pestycydami.

2 wspólne publikacje.

C) Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych

- 2013 - 2016** Osiemnastomiesięczny pobyt na Uniwersytecie Technicznym w Darmstadt, Niemczech w ramach Programu MOBILNOŚĆ PLUS.
- IV 2013** Miesięczny pobyt w Darmstadt, Uniwersytet Techniczny w Niemczech w ramach Programu wspólnego z DAAD wspierania Polsko-Niemieckiej wymiany osobowej związanej z realizacją projektów badawczych, w latach 2013-2014.
- I – III 2013** Dwumiesięczny pobyt w ramach stypendium DAAD w Darmstadt, Uniwersytet Techniczny w Niemczech.
- II - III 2011** Miesięczny pobyt w ramach stypendium CERC-WERC-IBRO InEurope w Darmstadt, Uniwersytet Techniczny w Niemczech.
- VIII 2007** Tygodniowy pobyt w Sektion Klinische Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin w Berlinie.
- I-II 2006** Miesięczny pobyt w Sektion Klinische Neurobiologie, Charité – Universitätsmedizin w Berlinie.
- X 2005** Dwutygodniowy pobyt w Zakładzie Farmakologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrze.
- XII 2004** Dwutygodniowy pobyt w Zakładzie Farmakologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrze.
- II-VI 2003** Stypendium naukowe Sokratesa na Uniwersytecie w Lund, Szwecja.

D) Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Dane z bazy Web of Science Core Collection, Citation Reports (JCR) Science Edition oraz Index Copernicus z dnia 27.03.2019.

Dorobek naukowo-badawczy obejmuje:

- 28 prac oryginalnych
- 1 praca przeglądowa
- 1 rozdział w książce
- 31 prezentacji posterowych jako autor prezentujący oraz 37 jako współautor. łącznie 68. W tym 14 na zjazdach krajowych oraz 54 na międzynarodowych.
- 6 wykładów na konferencjach, 9 wykładów poza Instytutem i na zaproszenie oraz 9 w IF PAN. łącznie 24.
- Sumaryczny impact factor (IF) wszystkich publikacji naukowych wynosi **89.815**, co odpowiada **722.5** punktom wg MNiSW i **115.82** punktom Index Copernicus
- Sumaryczny impact factor (IF) publikacji naukowych wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wynosi **19.607** co odpowiada **165** punktom wg MNiSW.
- Liczba cytowań publikacji wynosi 600 oraz 547 z wyłączeniem autocytowań.
- Index Hirsha publikacji wynosi **14**.

Katarzyna Kuter
02/04/2019
UKANOW