



**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ
NAUKOWYCH**

Bernadeta Szewczyk

**Zakład Neurobiologii
Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk**

Kraków 2017

SPIS TREŚCI

I. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
II. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
III. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	3
A) Tytuł osiągnięcia naukowego	3
B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa	3
C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	4
IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	29
A) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych	30
B) Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą	33
C) Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach	34
D) Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową	35
E) Referaty i wykłady wygłoszone na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych	35
F) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych	36
G) Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich	36
H) Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studenckimi	36
I) Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych	36

I. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

07/1997 - stopień magistra biologii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Krakowie, Wydział Geograficzno-Biologiczny. Praca magisterska wykonana w Zakładzie Fizjologii Zwierząt. Tytuł pracy „Aktywność ACHE w mózgu i mięśniach myszy obciążonych egzogenną serotoniną oraz poddanych stresowi immobilizacji” – promotor: prof. dr hab. Henryk Lach.

11/2002 – stopień doktora nauk biologicznych, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, Zakład Neurobiologii. Tytuł pracy „Rola cynku w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych” – promotor: prof. dr hab. Gabriel Nowak

06/2010 – Studia Podyplomowe z Biologii Molekularnej – Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

II. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1997-2000 - pracownik inżynierjno-techniczny w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie,

2000-2008 - asystent w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie,

2008-obecnie - adiunkt w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie,

III. OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DN. 14 MARCA 2003R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Rola receptora 5-HT_{1A}, cynku oraz ich wzajemnych interakcji w etiologii i terapii depresji”.

Uzyskane osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę habilitacji zostały przedstawione w monotematycznym cyklu siedmiu prac (6 prac oryginalnych i 1 przeglądowej), opublikowanych w latach 2009-2016. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych prac wynosi: **29,985** łączna punktacja KBN/MNiSW wynosi: **232** pkt.

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

(Prace przedstawiono w kolejności ich omawiania w punkcie IIIC)

1. Szewczyk B, Albert PR, Burns AM, Czesak M, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Konick LC, Dieter L, Herbst N, May W, Rajkowska G, Stockmeier CA, Austin MC. Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT_{1A} receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009a; 12(2):155-168 (IF=4.874; KBN/MNiSW=24, Oxford University Press)

2. Szewczyk B, Albert PR, Rogaeva A, Fitzgibbon H, May WL, Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Stockmeier CA, Woolverton WL, Kyle PB, Wang Z, Austin MC. Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT_{1A} receptor, in the

prefrontal cortex of subjects with major depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(8):1089-1101 (IF=4.699; KBN/MNiSW=32, Oxford University Press).

3. Szewczyk B, Kotarska K, Daigle M, Misztak P, Sowa-Kucma M, Rafała A, Curzytek K, Kubera M, Basta-Kaim A, Nowak G, Albert PR. Stress-induced alterations in 5-HT1A receptor transcriptional modulators NUDR and Freud-1. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17(11):1763-1775 (IF=4.009; KBN/MNiSW=40, Oxford University Press).

4. Szewczyk B, Pochwat B, Rafała A, Palucha-Poniewiera A, Domin H, Nowak G. Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc. *Neuropharmacology.* 2015; 99:517-26 (IF=4.936; KBN/MNiSW=40, Elsevier).

5. Szewczyk B, Poleszak E, Właż P, Wróbel A, Blicharska E, Cichy A, Dybała M, Siwek A, Pomierny-Chamioło L, Piotrowska A, Brański P, Pilec A, Nowak G. The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009b; 33(2):323-329 (IF=2.823; KBN/MNiSW=24, Elsevier).

6. Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, Rafała A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, Tanaka KF, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, **Szewczyk B**. Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT1A Receptors: In Vitro and In Vivo Studies. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(10):6869-6881 (IF=5.397; KBN/MNiSW=40, Springer).

7. Szewczyk B, Kubera M, Nowak G. The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35(3):693-701 (IF=3.247; KBN/MNiSW=32, Elsevier).

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

(Pozycje literatury wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego zostały zaznaczone pogrubioną czcionką)

1. Cel naukowo-badawczy

Badania naukowe, których wyniki zostały opisane w pracach przedstawionych w pkt. III B koncentrowały się wokół roli zaburzeń regulacji ekspresji receptora serotonergicznego 5-HT1A w etiologii depresji oraz poszukiwania nowych białek/szlaków sygnałowych, które mogą być zaangażowane w przeciwdepresyjne działanie cynku z uwzględnieniem roli receptora 5-HT1A. Badania dotyczące roli receptora 5-HT1A zostały zapoczątkowane podczas stażu podoktorskiego. Określenie przeciwdepresyjnych właściwości cynku to cel pracy doktorskiej. Moje obecne zainteresowania naukowe stanowią kontynuację zarówno jednych jak i drugich badań.

Główne cele przedstawionych powyżej prac to:

- określenie roli czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1, regulujących ekspresję receptora 5-HT1A w wywoływaniu zmian w poziomie białka tego receptora obserwowanych w depresji (badania postmortem, badania biochemiczne);
- określenie roli stresu, płci oraz wieku w wywoływaniu zmian w poziomie białek czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 oraz receptorów 5-HT1A w korze przedczołowej i hipokampie szczurów (samice, samce) w zwierzęcych modelach depresji: usunięcia opuszek węchowych, chronicznego łagodnego stresu oraz stresu prenatalnego (badania behawioralne, badania biochemiczne);
- określenie roli kinaz mTOR, PI3K i PKA w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku (badania biochemiczne);
- określenie roli układu serotonergicznego w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku oraz określenie roli cynku w modulowaniu funkcji receptora 5-HT1A (badania behawioralne);

2. Wprowadzenie w tematykę badawczą:

Depresja to jedna z najczęstszych chorób psychicznych. Szacuje się, że dotyka ona około 121 milionów ludzi na całym świecie a liczba chorych drastycznie wzrasta (Reddy, 2010; Ferrari i wsp., 2013). Depresja dotyka najczęściej osoby w średnim wieku ale coraz częściej pojawia również u dzieci, młodzieży i osób starszych. Jak wynika z danych statystycznych zaburzenia depresyjne występują dwa razy częściej u kobiet niż u mężczyzn (Reddy, 2010; Ferrari i wsp., 2013). Wszystkie badania jednoznacznie wskazują, że depresja wiąże się z dużym ryzykiem samobójstwa. U pacjentów z depresją jest ono ponad 20-krotnie większe niż w całej populacji. Niepokój budzi więc fakt, że pomimo niewątpliwego postępu, farmakoterapia depresji nadal nie jest w pełni skuteczna a molekularne mechanizmy depresji nie są w pełni wyjaśnione.

Neurobiologia zaburzeń depresyjnych

Wyniki badań klinicznych i przedklinicznych pozwoliły na sformułowanie szeregu hipotez wyjaśniających przyczyny rozwoju depresji. Jedną z pierwszych była tzw. hipoteza monoaminowa, która zakładała, że depresja jest wynikiem obniżenia stężenia monoamin (serotoniny, noradrenaliny) w strukturach mózgu odpowiedzialnych za procesy emocjonalne i poznawcze, takich jak kora przedczołowa (PFC), hipokamp (Hip) czy ciało migdałowate (Hindmarch 2001). Hipoteza ta powstała w oparciu o biologiczne mechanizmy działania

leków przeciwdepresyjnych (LPD), które wiążą się ze zwiększaniem transmisji serotonergicznej i noradrenergicznej. Efekt ten jest wynikiem hamowania funkcji transporterów tych monoamin (selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny, SSRI; selektywne inhibitory wychwyty serotoniny i noradrenaliny, SNRI) bądź hamowania aktywności enzymatycznej białek rozkładających monoaminy (inhibitory monoaminooksydazy, MAO). Zarówno leki z grupy SSRI jak i MAO nasilają transmisję monoaminergiczną po jednorazowym podaniu, ale ich efekt terapeutyczny widoczny jest dopiero 2-3 tygodnie po rozpoczęciu leczenia. Hipoteza monoaminowa w pierwotnej wersji nie tłumaczyła opóźnionego działania leków, dlatego też dalsze badania nad biologicznym podłożem depresji i mechanizmem działania LPD doprowadziły do modyfikacji jej treści. W nowym ujęciu hipoteza ta zakładała, że szybki wzrost stężenia monoamin w szczelinie synaptycznej, wywołany podaniem LPD, prowadzi do zmian adaptacyjnych w obrębie receptorów serotoninowych i noradrenergicznych, które warunkują efekt terapeutyczny (Stahl, 2008). Pojawienie się nowych leków o nietypowych mechanizmach działania, a także znaczny postęp wiedzy na temat depresji spowodował, że koncepcje dotyczące działania LPD jak również biologicznego podłoża depresji uległy dalszym modyfikacjom. Zwrócono uwagę na zjawiska biologiczne wiążące stres z depresją. Reakcja organizmu na stres, zwłaszcza długotrwały, powoduje zaburzenie czynności osi podwzgórze-przysadka-nadnercze (HPA). Nadaktywność osi HPA jest przyczyną wzmożonego uwalniania glikokortykosteroidów (Swaab i wsp., 2005). Zarówno w badaniach klinicznych jak i przedklinicznych wykazano z jednej strony zwiększoną aktywność osi HPA w depresji a z drugiej zanotowano normalizację aktywności osi HPA po podaniu chronicznym LPD w tym SSRI. Co więcej zauważono, że wpływ na oś HPA był skorelowany z poprawą obrazu choroby co sugeruje, że efekt hamowania funkcji tej osi może być związany z terapeutycznym efektem działania LPD (Jensen i wsp., 1999). Wiele uwagi poświęcono roli stresu i aktywacji osi HPA w powstawaniu zmian morfologicznych w mózgu, obserwowanych w depresji. Stwierdzono, że przewlekły stres wywołuje atrofię komórek piramidowych Hip jak również hamuje procesy neurogenezy (Manji i wsp., 2001). Te zmiany morfologiczno-funkcjonalne komórek nerwowych wiążą się z aktywacją osi HPA, nadmiernym uwalnianiem glikokortykosteroidów i uszkodzeniem neuronów glutaminianergicznych, serotonergicznych i dopaminergicznych (Manji i wsp., 2001). Wykazano ponadto, że aktywacja osi HPA wywołuje obniżenie poziomu czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (Ambrus i wsp., 2016), którego rola związana jest z regulacją przeżywalności neuronów i osłabieniem procesów prowadzących do śmierci komórek

(Duman i wsp., 2006). Stwierdzono, z jednej strony, że obniżony poziom BDNF powoduje atrofię komórek Hip oraz zmniejszenie objętości Hip w mózgu osób chorych na depresję. Z drugiej strony działanie LPD prowadzi do nasilonej ekspresji tego czynnika a co za tym idzie, do zwiększonej przeżywalności neuronów i zahamowania wywołanych stresem procesów neurodegeneracyjnych. Istotnym aspektem potwierdzającym rolę BDNF w mechanizmie działania LPD są sugerowane zmiany adaptacyjne, które pojawiają się po zastosowaniu LPD. Zmiany te dotyczą procesów transkrypcji i translacji białek zaangażowanych w procesy plastyczności synaptycznej. Jednym z wielu elementów odpowiedzi komórkowych na zastosowane LPD w tym także SSRI jest wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. cyclic AMP-responsive element binding) w Hip, który reguluje ekspresję genów związanych z plastycznością synaps oraz czynników troficznych dla neuronów w tym BDNF (Duman i wsp., 2006). Zarówno BDNF jak i neurotrofina -3 (NT-3) stymulują funkcję neuronów serotonergicznym i noradrenergicznym co przejawia się m.in. nasileniem metabolizmu serotoniny i noradrenaliny w Hip (Altar, 1999).

Niekorzystnym następstwem działania przewlekłego stresu oraz glikokortykosteroidów na neurony może być również nasilone uwalnianie glutaminianu oraz zjawisko ekscytotoksyczności neuronalnej, u podłoża którego leży nadmierna aktywacja glutaminianergicznego receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) (Miladinovic i wsp., 2015). Potwierdzeniem tej hipotezy było wykazanie, że antagoniści receptora NMDA normalizują zwiększony na skutek działania glikokortykosteroidów zewnątrzkomórkowy poziom glutaminianu (Musazzi i wsp., 2011). Ponadto w wielu badaniach klinicznych zaobserwowano zarówno podwyższony jak i obniżony poziom glutaminianu w surowicy chorych na depresję a także wahania w stężeniach glutaminianu m.in. w PFC, co wydaje się być zgodne z hipotezą mówiącą o rozregulowaniu transmisji glutaminianergicznej w depresji (Krystal i wsp., 2013). Istotną rolę receptora NMDA w depresji i mechanizmie działania LPD podkreślają również wyniki badań behawioralnych i biochemicznych. Stwierdzono, że funkcjonalni antagoniści receptora NMDA wykazują działanie przeciwdepresyjne w testach i modelach depresji (Trullas i Skolnick 1990). Ponadto, chronicznie stosowane LPD wywołują zmiany adaptacyjne w kompleksie receptora NMDA prowadzące do osłabienia funkcji tego receptora i w efekcie do zahamowania neurotransmisji glutaminianergicznej (Skolnick, 1999). Prace badawcze poświęcone układowi glutaminianergicznemu a zwłaszcza roli związków blokujących receptor NMDA stanowią nadal istotny aspekt badań nad neurobiologicznymi fundamentami depresji oraz mechanizmami leczenia depresji.

Kolejną hipotezą, która próbuje wyjaśnić mechanizm patogenezy depresji jest tzw. hipoteza zaburzenia homeostazy cynku. Zarówno badania kliniczne jak i przedkliniczne pokazują jednoznacznie, że niedobór cynku w diecie jest czynnikiem ryzyka wystąpienia depresji. Rosnąca liczba doniesień klinicznych wskazuje, że obniżone stężenie cynku w surowicy może stanowić marker zaburzeń depresyjnych (Siwek i wsp., 2013). Istnieją również dane świadczące o pozytywnym działaniu suplementacji cynkiem w odwracaniu objawów depresji (Rafało i wsp., 2016).

3. Rola receptora 5-HT1A w depresji

Serotonina jest jednym z najważniejszych neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Jak wspomniano powyżej, hipoteza która wiąże występowanie zaburzeń depresyjnych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu serotonergicznego w mózgu jest jedną z najważniejszych hipotez wyjaśniających patogenezę depresji a poszukiwanie nowych LPD w grupie związków wpływających na układ serotonergiczny pozostaje nadal obiecującym i aktualnym kierunkiem badań.

Synteza serotoniny jest ściśle związana z poziomem tryptofanu w mózgu oraz aktywnością enzymu hydroksylazy tryptofanowej (TPH), zwłaszcza TPH2. Serotonina jest magazynowana w pęcherzykach synaptycznych a po uwolnieniu do szczeliny synaptycznej działa na swoiste receptory (Best i wsp., 2010). Spośród wielu receptorów zasadniczą rolę w regulacji funkcji układu serotonergicznego przypisuje się receptorom 5-HT1A. Największe zagęszczenie receptorów 5-HT1A znajduje się w Hip, ciele migdałowatym, korze mózgowej, wzgórzu, podwzgórzu i jądrach szwu pnia mózgu. Receptory te występują zarówno jako receptory presynaptyczne (autoreceptory), umiejscowione na ciałach komórkowych bądź dendrytach neuronów serotonergicznym jądrach szwu, jak również jako receptory postsynaptyczne zlokalizowane na neuronach nie-serotonergicznym w obszarach korowo-limbicznych OUN, do których dochodzą zakończenia neuronów 5-HT (Albert i Lemonde, 2004). Pobudzenie autoreceptorów prowadzi do zahamowania uwalniania 5-HT do przestrzeni synaptycznej w wyniku sprzężenia zwrotnego i w efekcie do osłabienia przekaźnictwa w neuronach serotonergicznym. Pobudzenie postsynaptycznym receptorów 5-HT1A prowadzi natomiast do hamowania innych neuronów zlokalizowanych w różnych obszarach mózgu (Wróbel i Marciniak, 2015; Artigas, 2015).

Wyniki badań klinicznych oraz przedklinicznych świadczą, że zarówno pre- jak i postsynaptyczne receptory 5-HT1A są zaangażowane w patogenezę depresji oraz mechanizm działania LPD (Savitz i wsp., 2009). Badania z wykorzystaniem technik neuroobrazowania

oraz badania postmortem wykazały zmiany zarówno ekspresji mRNA jak i gęstości białka receptorów 5-HT1A w mózgu osób z depresją i ofiar samobójstw (Albert i Lemonde, 2004; Savitz i wsp., 2009). Najnowsze badania pokazują natomiast, że zmiany w regulacji ekspresji genu receptora 5-HT1A mogą stanowić ważny czynnik predysponujący do wystąpienia depresji. Charakterystyka sekwencji regionu promotorowego genu receptora 5-HT1A wykazała istnienie wielu elementów hamujących (represory) lub wzmacniających (enhancery) inicjację transkrypcji oraz polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, które wpływają na wiązanie się czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genu (Albert i wsp., 2011). Zaobserwowano także zależność pomiędzy skutecznością LPD i podatnością na wystąpienie zaburzeń depresyjnych, a występowaniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (C(-1019)G) w regionie promotorowym genu receptora 5-HT1A (Albert i Lemonde, 2004). Sugeruje się, że zmiany w funkcjonowaniu czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję receptora 5-HT1A mogą przyczyniać się do towarzyszących depresji zaburzeń poziomu tego receptora lub też mogą kompensować zmiany związane z chorobą (Albert i wsp., 2010)

Szczególną rolę w regulacji ekspresji genu receptora 5-HT1A przypisuje się takim czynnikom transkrypcyjnym jak: NUDR/Deaf-1 (ang. nuclear deformed epidermal autoregulatory factor 1) oraz Freud-1 (ang. five-prime repressor element under dual repression/coiled-coil C2 domain-1A, Freud-1/CC2D1A). NUDR jest ssaczym homologiem występującego u muszki owocowej genu Deaf-1 (ang. deformed epidermal autoregulatory factor-1), kodującego białko wiążące DNA i biorące udział w regulacji transkrypcji (Huggenvik i wsp., 1998). Badania *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowej RN46A wykazały, że NUDR hamuje transkrypcję z konstruktów reporterowego genu lucyferazy połączonego z promotorem genu receptora 5-HT1A, a jego stabilna ekspresja w komórkach jąder szwu obniża poziom mRNA oraz poziom białka i aktywność wiązania receptora 5-HT1A (Lemonde i wsp., 2003). Co ciekawe, to hamujące ekspresję genu i białka receptora 5-HT1A działanie NUDR jest charakterystyczne wyłącznie dla komórek serotonergicznymi. W komórkach nie serotonergicznymi (neurony postsynaptyczne) kory czołowej NUDR zwiększa ekspresję receptorów 5-HT1A (Czesak i wsp., 2006), nie wpływa natomiast na ekspresję tych receptorów w Hip. Zróżnicowane działanie NUDR w regulacji ekspresji receptora 5-HT1A zostało potwierdzone w badaniach *in vivo* (Czesak i wsp., 2012). Wykazano, że myszy z usuniętym genem NUDR wykazują podwyższony poziom mRNA i białka receptora 5-HT1A w jądrach szwu, obniżony poziom ekspresji tego receptora w korze czołowej oraz niezmienny poziom mRNA i białka receptora 5-HT1A w Hip.

Freud-1 należy do rodziny składającej się z dwóch homologicznych genów: Freud-1 i Freud-2 (Hadjighassem i wsp., 2009). Freud-1 wiąże się do elementu regulatorowego promotora genu 5-HT1A (FRE, 5'-repressor element) obniżając jego wyjściową ekspresję zarówno w serotoninerгіcznych jak i nie serotoninerгіcznych neuronach. Freud-1 występuje w postaci dwóch izoform: krótka forma (Freud-1S), która występuje głównie w komórkach zwierzęcych oraz długa forma (Freud-1L), która występuje w komórkach ludzkich (Rogaeva i wsp., 2007).

Badania na zwierzętach wykazały ekspresję zarówno NUDR jak i Freud-1 w neuronach PFC, Hip i jądrach szwu mózgu. Udowodniono ponadto, że komórki pozytywne pod względem ekspresji białka receptora 5-HT1A wykazują również ekspresję białka Freud-1 oraz NUDR (Lemonde i wsp., 2003; Ou i wsp., 2003).

3.1. Udział czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 w wywoływaniu zmian w ekspresji receptora serotoninowego 5-HT1A obserwowanych w depresji

Biorąc pod uwagę rolę NUDR/Freud-1 w regulacji transkrypcji genu receptora 5-HT1A, kolokalizację NUDR/Freud-1 z receptorami 5-HT1A w neuronach oraz dane wskazujące na zmiany ekspresji receptorów 5-HT1A w depresji, postanowiono oznaczyć poziom tych białek w tkance mózgowej pacjentów ze zdiagnozowaną depresją oraz sprawdzić czy zmiany w poziomie NUDR/Freud-1 korelują ze zmianami w ekspresji receptorów 5-HT1A. W badaniach immunohistochemicznych określono strukturalną i komórkową lokalizację NUDR i Freud-1, natomiast w badaniach z wykorzystaniem metody Western blot oznaczono poziom białek NUDR/Freud-1 i 5-HT1A w PFC w pól Brodmanna 10 (BA10) mózgu kobiet i mężczyzn chorych na depresję oraz osób zdrowych (Szewczyk i wsp., 2009a, Szewczyk i wsp., 2010). Do badań wykorzystano tkankę pobraną od 13 kobiet i 12 mężczyzn z depresją oraz 13 kobiet i 12 mężczyzn bez historii zaburzeń psychicznych (grupa kontrolna). Próbkę sparowano pod względem płci pacjentów oraz najbliżej jak to było możliwe pod względem wieku i czasu, jaki upłynął od śmierci do momentu pobrania tkanki.

Badania postmortem z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej zidentyfikowały ekspresję NUDR w neuronach PFC ludzkiego mózgu. Co więcej, komórki których stwierdzono ekspresję białka NUDR wykazywały również ekspresję receptora 5-HT1A (Szewczyk i wsp., 2009a). Analizy z wykorzystaniem metody Western blot pokazały obniżony poziom białka NUDR w PFC kobiet ze zdiagnozowaną depresją oraz brak zmian w poziomie tego białka w PFC mężczyzn z depresją w porównaniu do odpowiedniej grupy kontrolnej. Również poziom białka 5HT1A był obniżony w PFC kobiet ze zdiagnozowaną

depresją i niezmienny w PFC mężczyzn z depresją. Wyniki te potwierdzają więc funkcję NUDR jako czynnika zwiększającego ekspresję receptora 5-HT1A w PFC (Czesak i wsp., 2006) i sugerują, że zaobserwowany w PFC kobiet z depresją spadek ekspresji receptora 5-HT1A może wynikać z zaburzonej funkcji czynnika NUDR. Jest to jedynie przypuszczenie, ponieważ dokładny mechanizm zależnej od płci regulacji ekspresji czynnika NUDR nie został do tej pory poznany.

Ostatnie badania dotyczące polimorfizmu rs6295 w obrębie promotora genu 5-HT1A wykazały, że allel G predysponujący do wystąpienia depresji nie wykazuje zdolności wiązania czynnika NUDR, co w konsekwencji prowadzi do podwyższenia transkrypcji 5-HT1A w neuronach pochodzących z jądra szwu (gdzie NUDR działa jako represor) oraz jej obniżenia w neuronach pochodzących z kory (gdzie NUDR pełni rolę aktywatora) (Donaldson i wsp., 2016). Dane te potwierdzają uzyskane przez nas wyniki przemawiające za znaczeniem obniżonego korowego poziomu NUDR w przebiegu depresji (**Szewczyk i wsp., 2009a**).

W następnym etapie badań skoncentrowano się na ocenie ekspresji białka drugiego czynnika transkrypcyjnego a mianowicie Freud-1. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność tego białka w neuronach oraz jego kolokalizację z receptorami 5-HT1A w komórkach nerwowych PFC mózgu ludzkiego (**Szewczyk i wsp., 2010**). Badania z wykorzystaniem techniki Western blot wykazały natomiast zmniejszenie poziomu białka Freud-1 w PFC mężczyzn z depresją w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. W PFC kobiet cierpiących na depresję zaobserwowano jedynie trend w kierunku obniżonego poziomu białka Freud-1. Analiza uzyskanych wyników w korelacji do wieku pacjentów (kobiet i mężczyzn) wykazała znacznie wyraźniejszy spadek poziomu białka Freud-1 u pacjentów młodszych (<58 lat). Podobnie białko receptora 5-HT1A było obniżone w PFC pacjentów młodszych w porównaniu do pacjentów kontrolnych z tej samej grupy wiekowej.

Podsumowanie. Badania postmortem wykazały obniżony poziom czynnika transkrypcyjnego NUDR oraz receptora 5-HT1A w PFC kobiet, ale nie mężczyzn ze zdiagnozowaną depresją (**Szewczyk i wsp., 2009a**). W przeciwieństwie do tego, poziom białka Freud-1 okazał się znacznie obniżony w PFC mężczyzn z depresją i niezmienny w PFC kobiet z depresją w porównaniu do poziomu Freud-1 w PFC osób z grup kontrolnych (**Szewczyk i wsp., 2010**). Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto hipotezę, że obniżony poziom białka Freud-1 w PFC mężczyzn z depresją może stanowić zmianę adaptacyjną mającą na celu utrzymanie prawidłowego poziomu receptorów 5-HT1A (pamiętając, że Freud-1 działa jako represor transkrypcji genu tych receptorów). Z drugiej

strony, nie zaobserwowano zmiany w poziomie białka Freud-1 w PFC kobiet z depresją (zaobserwowano jedynie tendencję w kierunku zmniejszonej ekspresji). Można przypuszczać, że taka zmiana adaptacyjna nie jest wystarczająca, aby zniwelować deficyt ekspresji NUDR (wzmacniacza transkrypcji genu receptorów 5-HT1A), a tym samym zapobiec obniżeniu poziomu receptorów 5-HT1A u kobiet z depresją. Dane te sugerują, że zmiany w poziomie czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 regulujących poziom ekspresji receptora 5-HT1A u osób z depresją mogą być zależne od płci i mogą stanowić jedną z przyczyn warunkujących częstsze występowanie depresji u kobiet.

3.2. Zmiany w poziomie czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 w wybranych zwierzęcych modelach depresji

Badania dotyczące poziomu czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 w mózgu prowadzono również na zwierzętach. Badania przedkliniczne z wykorzystaniem modelu stresu unieruchomienia ujawniły obniżony poziom mRNA i białka czynnika Freud-1, ale nie NUDR oraz podwyższony poziom mRNA receptora 5-HT1A w PFC samców szczurów (Iyo i wsp., 2009). W pracy Kieran i wsp., (2010), wykazano natomiast brak zmian w poziomie mRNA Freud-1/NUDR oraz obniżony poziom mRNA receptora 5-HT1A w modelu chronicznego socjalnego stresu (Kieran i wsp., 2010). Należy podkreślić, że regulacja analizowanych czynników transkrypcyjnych może wystąpić na etapie post-translacyjnym, bez zmian w poziomie RNA czy białka. Przykładowo, wiązanie Freud-1 do DNA i jego funkcja jako czynnika hamującego ekspresję receptora 5-HT1A jest blokowana przez mechanizm zależny od wapnia i kalmoduliny (Ou i wsp., 2003).

Biorąc pod uwagę te dane, zaplanowano kolejne badania, których celem było dalsze wyjaśnienie, czy obserwowane w depresji zmiany w poziomie czynników transkrypcyjnych (NUDR, Freud-1) regulujących ekspresję receptorów 5-HT1A są zróżnicowane w zależności od płci i badanej struktury mózgu zwierząt. W badaniach wykorzystano zwierzęce modele depresji: model usunięcia opuszek węchowych (OB), model stresu prenatalnego (PS) oraz model chronicznego łagodnego stresu (CMS). Zmiany w poziomie mRNA i białka NUDR, Freud-1 oraz 5-HT1A analizowano zarówno u samców jak i u samic w modelach OB i PS. W przypadku modelu CMS badania prowadzono jedynie na samcach.

OB wywołuje u zwierząt szereg zmian behawioralnych (zwiększona aktywność wywołana stresem, drażliwość, zaburzenia uczenia, zaburzenia interakcji społecznych i seksualnych) oraz biochemicznych, zwłaszcza w systemie serotonergicznym (van Riesen i wsp., 1976; Willner, 1990). W przeprowadzonych przez nas badaniach OB spowodowało

obniżenie poziomu białka czynnika Freud-1 i receptora 5-HT1A w PFC samców, ale nie samic szczurów. Nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomie mRNA badanych białek w PFC. W Hip, OB zmniejszyło ekspresję genów NUDR, Freud-1 i 5-HT1A u samców oraz wyłącznie ekspresję genu NUDR u samic.

Kolejnym zastosowanym przez nas zwierzęcym modelem depresji był PS. Przewlekły stres podczas prenatalnego rozwoju mózgu wywołuje różnego rodzaju nieprawidłowości w zachowaniu i uczeniu się oraz zaburzenia psychiczne w późniejszym życiu (Huizink i wsp., 2004). Jedną ze zmian biochemicznych indukowanych przez PS jest osłabienie transmisji serotonergicznego w mózgu (Hayashi i wsp., 1998). W prezentowanych badaniach jedynymi zaobserwowanymi zmianami wywołanymi przez PS były obniżony poziom białka receptora 5-HT1A w PFC samic szczurów oraz zmniejszenie ekspresji genu NUDR w Hip samców. Co ciekawe, oznaczenia przeprowadzone w PFC i Hip ciężarnych samic szczurów poddanych stresowi unieruchomienia w ciągu ostatniego tygodnia ciąży wykazały zmniejszenie poziomu białek NUDR, Freud-1 i 5-HT1A w PFC oraz brak zmian w poziomie mRNA. W Hip stresowanych samic zaobserwowano natomiast spadek poziomu ekspresji genów NUDR i Freud-1 oraz spadek poziomu białka Freud-1.

Trzeci zwierzęcy model depresji zastosowany w niniejszych badaniach to CMS. CMS jest znanym modelem opracowanym w celu wywołania anhedonii (zmniejszona wrażliwość na nagradzanie), która jest częstym objawem depresji u ludzi (Willner, 2005). Podobnie jak w przypadku PS oraz OB, CMS również wywołuje zmiany neurobiologiczne prowadzące do zaburzeń funkcji układu serotonergicznego (Willner, 2005). W modelu CMS badania przeprowadzono jedynie na samcach. Nasze badania wykazały zmniejszony poziom zarówno mRNA jak i białka NUDR oraz receptora 5-HT1A, a także obniżony poziom mRNA Freud-1 w PFC samców szczurów. W Hip, CMS spowodował spadek poziomu białka Freud-1 i receptora 5-HT1A.

Opisane powyżej wyniki badań przedklinicznych wykazały, że zmiany w poziomie NUDR/Freud-1 mogą odgrywać istotną rolę, przy czym zaangażowanie tych białek jest zróżnicowane w zależności od modelu depresji, a tym samym czynników wywołujących zachowania depresyjne u zwierząt. Zmniejszony poziom białka NUDR obserwowany w PFC samców poddanych procedurze CMS oraz u stresowanych chronicznie ciężarnych samic wskazują na to, że stres oraz wiek odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego.

W badaniach postmortem wykazano korelację pomiędzy obniżoną ekspresją NUDR i 5-HT1A w PFC kobiet, ale nie mężczyzn z depresją (Szewczyk i wsp., 2009). Badania

przeprowadzone na zwierzętach wskazują natomiast, że zmiany w poziomie NUDR nie są charakterystyczne tylko dla samic. Zmniejszony poziom ekspresji NUDR zaobserwowano również u samców w modelu CMS (Szewczyk i wsp., 2014). Należy jednak pamiętać, że modele zwierzęce nie odzwierciedlają pełnego obrazu depresji występującej u ludzi dlatego trudno jest określić precyzyjnie mechanizm zaobserwowanych zmian.

Uzyskane wyniki dowodzą, że płeć ma również znaczenie w regulacji ekspresji receptora 5-HT1A, ale zmiany te są zróżnicowane w zależności od modelu depresji. Obniżony poziom białka receptora 5-HT1A zaobserwowano w modelu OB u samców i w modelu PS u samic. Zmiany poziomu ekspresji tego receptora obserwowane w zwierzęcych modelach depresji były ponadto zróżnicowane w zależności od badanej struktury mózgu (PFC, Hip). Wydaje się również, że zmiany te powstają prawdopodobnie w wyniku zaburzonych procesów translacji i/lub zmian potranslacyjnych.

Podsumowanie. Przeprowadzone przez nas badania z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych wykazały, że towarzyszące depresji zaburzenia poziomu receptorów 5-HT1A mogą być związane ze zmianami w ekspresji czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1. Ponadto poziom i aktywność tych czynników transkrypcyjnych w poszczególnych strukturach mózgu (PFC, Hip) wydają się być uzależnione od wielu zmiennych takich jak płeć, wiek czy przebyty stres. Badania przedkliniczne potwierdzają postawioną na podstawie badań postmortem hipotezę o zaangażowaniu czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 w powstawaniu zmian w ekspresji receptorów 5-HT1A obserwowanych w depresji.

4. Cynk a depresja

Fizjologiczna rola cynku

Cynk to jeden z mikroelementów niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Pierwiastek ten jest składnikiem około 300 enzymów w których pełni rolę zarówno stabilizatora struktury przestrzennej jak i kofaktora. Około 10% białek obecnych w organizmie człowieka zawiera w swoim składzie cynk (Andreini i wsp., 2006). Stężenie cynku utrzymane w normie fizjologicznej warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój organizmu, odpowiednie działanie układu odpornościowego jak również właściwe funkcjonowanie centralnego systemu nerwowego. Mózg zawiera stosunkowo dużo cynku w porównaniu do innych organów (Takeda, 2000; Kambe i wsp., 2015). Największe stężenie cynku obserwuje się w korze i Hip a więc strukturach mózgu, które odgrywają istotną rolę w patofizjologii zaburzeń psychicznych (Koolschijn i wsp., 2009). 90% puli cynkowej obecnej w mózgu

stanowi cynk związany z białkami takimi jak enzymy czy czynniki transkrypcyjne. Pozostała część występuje jako tzw. wolny cynk, zlokalizowany głównie wewnątrz pęcherzyków synaptycznych (Takeda, 2000). Neurony, które zawierają jony cynku w pęcherzykach synaptycznych to głównie neurony glutaminianergiczne (Karol i wsp., 2010). W wyniku pobudzenia tych neuronów cynk jest uwalniany razem z glutaminianem do przestrzeni synaptycznej. W ten sposób cynk wspólnie z glutaminianem moduluje transmisję synaptyczną w układzie glutaminianergicznym. Cynk jest endogennym modulatorem receptorów glutaminianergicznych takich jak: NMDA i AMPA (kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy). Cynk moduluje również funkcję hamujących receptorów GABA (kwas gamma-aminomasłowy) (Takeda, 2010). Wszystkie wymienione powyżej typy receptorów odgrywają istotną rolę w patofizjologii depresji i mechanizmie działania LPD (Sanacora i wsp., 2012).

Rola cynku w etiologii depresji oraz mechanizmie działania LPD

Wyniki badań klinicznych wskazują, że wahania w stężeniach cynku mogą być czynnikiem ryzyka wystąpienia zaburzeń psychicznych. Wykazano, że wartości stężenia cynku w surowicy pacjentów ze zdiagnozowaną depresją były znacznie niższe niż u osób zdrowych (grupy kontrolne) (McLoughlin i Hodge, 1990; Maes i wsp., 1994, 1997, 1999, Wójcik i wsp., 2006; Maserejian i wsp., 2012; Jacka i wsp., 2012). W przypadku niektórych pacjentów depresyjnych wykazano ujemną korelację pomiędzy poziomem cynku a nasileniem objawów depresji jak również długością trwania epizodów depresyjnych (Maes i wsp., 1994, 1997, 1999, Wójcik i wsp., 2006, Siwek i wsp., 2010). Zaobserwowano ponadto, że stężenie cynku w surowicy pacjentów z depresją lekooporną było znacznie niższe niż w surowicy pacjentów odpowiadających na leczenie (Maes i wsp., 1997). Wykazano również, że po zastosowaniu skutecznej terapii przeciwdepresyjnej obniżony poziom cynku w surowicy krwi pacjentów depresyjnych ulegał normalizacji (McLoughlin i Hodge, 1990). Opisane powyżej wyniki sugerują, iż stężenie cynku w surowicy może stanowić marker zaburzeń depresyjnych.

Jedną z przyczyn obniżonego poziomu cynku w organizmie jest nieodpowiednia podaż tego pierwiastka w diecie. Badania kliniczne wskazują, że deficyt cynku w diecie może być czynnikiem ryzyka prowadzącym do zaburzeń psychicznych. Wykazano, istotną korelację pomiędzy niską podażą cynku w diecie a występowaniem objawów depresji (patrz prace przeglądowe Siwek i wsp., 2013; Rafało i wsp., 2016). Warto podkreślić, że tego typu korelację obserwowano częściej w przypadku badanych kobiet niż mężczyzn (Maserejian i

wsp., 2012), co może mieć związek z większym ryzykiem wystąpienia depresji właśnie u kobiet.

Znaczenie prawidłowego stężenia cynku dla właściwego funkcjonowania centralnego systemu nerwowego ukazują również badania przedkliniczne. Zmniejszenie zawartości cynku w diecie zarówno u myszy jak i szczurów prowadzi do wystąpienia u zwierząt „zachowań pro-depresyjnych” obserwowanych jako: a) wydłużony czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (FST) i zawieszenia za ogon (TST), b) zmniejszenie ilości wypijanego roztworu sacharozy (objaw anhedonii) czy c) osłabienie interakcji socjalnych, (Szewczyk, 2013; Doboszevska 2015a,b). Niektóre z tych efektów były odwracane po podaniu fluoksetyny (SSRI) (Doboszevska i wsp., 2015b).

Dotychczas opisane wyniki wskazują na pewne efekty fizjologiczne lub zaburzenia behawioralne związane z deficytem cynku. Należy jednak podkreślić, że istnieje szereg badań wskazujących na przeciwdepresyjne własności cynku (prace przeglądowe **Szewczyk i wsp., 2011**; Szewczyk, 2013). Przeciwdepresyjną aktywność cynku (skrócenie czasu bezruchu) wykazano zarówno w testach przesiewowych (FST, TST) (**Szewczyk i wsp., 2011**) jak i modelach depresji: OB (Nowak i wsp., 2003b); CMS (Sowa-Kucma i wsp., 2008); przewlekłego nieprzewidywalnego stresu (CUS) (Cieślik i wsp., 2007). Stwierdzono ponadto, że cynk zwiększa efektywność działania LPD (imipramina, fluoksetyna, paroksetyna, bupropion lub citalopram) w tych testach i modelach depresji. (**Szewczyk i wsp., 2011**; Szewczyk, 2013). Pozytywne efekty suplementacji cynkiem wykazano również w badaniach klinicznych. Zwiększenie skuteczności zastosowanej terapii zaobserwowano wśród pacjentów u których cynk podawano łącznie z lekami z grupy SSRI, leków trójcyklicznych ale nie SNRI (Rafał i wsp., 2016) co po raz kolejny sugeruje, że suplementacja cynkiem może przynieść pozytywny efekt terapeutyczny jedynie w przypadku wybranych LPD. W roku 2015 opublikowano ponadto wyniki badań klinicznych, które wskazują na możliwość zastosowania cynku w monoterapii zaburzeń depresyjnych (Solati i wsp., 2015).

Głównym mechanizmem, który wydaje się być odpowiedzialny za skuteczność cynku w zwierzęcych testach i modelach depresji jest hamowanie funkcji receptora NMDA. Wykazano, że przeciwdepresyjne działanie cynku w teście FST było blokowane podaniem kwasu NMDA (specyficzny agonista receptora NMDA) oraz podaniem D-seryny (agonista miejsca glicynowego receptora NMDA) (Cichy i wsp., 2009; Szewczyk i wsp., 2010). Przeciwdepresyjne działanie cynku w FST było również blokowane podaniem związku NBQX (antagonista receptora AMPA) (Szewczyk i wsp., 2010) co sugeruje, że również receptor AMPA może odgrywać istotną rolę w mechanizmie działania cynku. Uzyskane dane,

świadczą ponadto o tym, że aktywność przeciwdepresyjna cynku może być związana z modulacją funkcji układu serotonergicznego. Wykazano, że cynk podawany chronicznie zwiększa gęstość receptorów 5-HT1A w Hip oraz 5-HT2A w korze szczurów (Cichy i wsp., 2009). Co więcej cynk nasila działanie LPD, których mechanizm działania związany jest z regulacją transmisji serotonergicznego (fluoksetyna, paroksetyna, citalopram) (Cunha i wsp., 2008; Szewczyk i wsp., 2002).

Wyniki badań biochemicznych wykazały także, że efektem chronicznych podań cynku jest wzrost mRNA i białka BDNF, jednak mechanizm powstawania tych zmian nie został wyjaśniony (Franco i wsp., 2008; Nowak i wsp., 2004).

Opisane powyżej wyniki sugerują mechanizmy, które wydają się być odpowiedzialne za efekty przeciwdepresyjne cynku ale nie wyjaśniają w pełni molekularnego podłoża obserwowanych zmian (**Szewczyk i wsp., 2011**). Dlatego celem kolejnych prac było poszukiwanie molekularnych mechanizmów przeciwdepresyjnego działania cynku z uwzględnieniem roli wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału oraz interakcji cynku z receptorami 5-HT1A.

4.1. Zaangażowanie aktywacji szlaku kinazy mTOR w przeciwdepresyjne działanie cynku

W 2000r. Berman i wsp., a następnie Zarate i wsp., (2006) opublikowali wyniki badań, które wskazywały, że pojedyncza dawka ketaminy (antagonista receptora NMDA), powoduje szybki i długotrwały efekt przeciwdepresyjny utrzymujący się nawet do 7 dni od podania. Jakkolwiek mechanizm przeciwdepresyjnego działania ketaminy nie jest do końca poznany, badania na zwierzętach wykazały, że w jej szybkim działaniu uczestniczy aktywacja kinazy mTOR (ang. mammalian target of rapamycin), której towarzyszy zwiększona synteza białek synaptycznych takich jak: białko gęstości postsynaptycznej 95 (PSD95); synapsyna I (białko gęstości presynaptycznej), GluA1 (podjednostka receptora AMPA) oraz wzrost liczby synaps w PFC (Li i wsp., 2010; Zhou i wsp., 2014). Aktywacja kinazy mTOR jest również zaangażowana w przeciwdepresyjne działanie związku Ro-25-6981 - selektywnego antagonisty podjednostki 2B receptora NMDA (Li i wsp., 2010; Workman i wsp., 2013) oraz związku GLYX-13 będącego częściowym funkcjonalnym agonistą miejsca glicynowego receptora NMDA (Lu i wsp., 2014).

Wyżej opisane wyniki badań dotyczące przeciwdepresyjnej aktywności antagonistów receptora NMDA jak również fakt, że cynk jest jednym z kluczowych modulatorów receptora NMDA (**Szewczyk, 2011**; Pochwat et al., 2014) przyczyniły się do zainicjowania badań

dotyczących roli kinazy mTOR w przeciwdepresyjnym działaniu cynku (Szewczyk i wsp., 2015).

Kinaza serynowo/treoninowa mTOR odgrywa istotną rolę w procesach przeżywalności neuronów i syntezy białek w synapsach, a tym samym w regulacji plastyczności synaptycznej (Hoeffler i Klann, 2010). mTOR tworzą dwa heteromeryczne, funkcjonalnie odrębne kompleksy białkowe: mTORC1, który jest odpowiedzialny za regulację procesów transkrypcji, translacji czy autofagii oraz mTORC2, który reguluje cytoskielet aktynowy, aktywność kinazy białkowej B (AKT PKB) oraz kinazy białkowej C (PKC) (Hoeffler i Klann, 2010). Aktywność kompleksów kinazy mTOR można rozróżnić farmakologicznie poprzez zastosowanie specyficznego inhibitora tej kinazy - rapamycyny, która hamuje kompleks mTORC1 ale nie mTORC2 (Zheng i wsp., 2014). Do najlepiej opisanych czynników, które modulują funkcję mTOR w neuronach należą: insulina, czynniki neurotroficzne jak choćby BDNF i jego receptor TrkB oraz glutaminian działający poprzez receptory NMDA (Gong i wsp., 2006). Stymulacja receptorów NMDA lub TrkB aktywuje kinazę 3-fosfatydiloinozytolu (PI3K), kinazę białkową Akt lub kinazę regulowaną zewnątrzkomórkowo ERK, które są z kolei głównymi aktywatorami kompleksu mTORC1. Aktywność tego kompleksu może być również pośrednio modulowana poprzez kompleks mTORC2 z udziałem kinaz Akt oraz PKC. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek efektorowych kinazy mTOR jest kinaza p70-S6 (S6K). Aktywowana kinaza S6K może stymulować inicjację syntezy białek poprzez fosforylację rybosomalnego białka S6 i innych białek biorących udział w translacji takich jak eukariotyczny czynnik elongacji 2 (eEF2) (Hoeffler i Klann, 2010).

Początkowe doświadczenia zawarte w pracy Szewczyk i wsp., (2015) zaprojektowano w celu określenia, czy cynk, antagonist receptoru NMDA, podobnie do innych związków blokujących funkcję tego receptora (Pochwat i wsp., 2014) może wywoływać wydłużone w czasie działanie przeciwdepresyjne po jednorazowym podaniu. Stwierdzono, że cynk podany 30min jak i 3h przed testem wywołuje efekt przeciwdepresyjny u szczurów w teście FST. Natomiast nie wykazuje on działania przeciwdepresyjnego 24h po podaniu. Zaobserwowano ponadto, że efekt przeciwdepresyjny cynku był związany z aktywacją kinazy mTOR w PFC szczurów. Podanie cynku skutkowało krótkotrwałą, wzmożoną fosforylacją kinazy mTOR oraz białka p70S6K. Podwyższony poziom aktywnych, ufosforylowanych form powyższych białek odnotowano 30min i 3h po podaniu cynku. Po 24 godzinach stopień ufosforylowania zarówno mTOR jak i p70S6K powrócił do stanu wyjściowego. Dodatkowo 3h po podaniu cynku zaobserwowano wzrost poziomu takich białek jak BDNF, GluA1 i synapsyny I (wzrost

syntezy tych białek obserwowano także po podaniu ketaminy; Autry i wsp., 2011; Li et al, 2010.; Zhou i wsp., 2014). Co ciekawe poziom białek GluA1 i synapsyny I był podwyższony również po 24h od podania cynku a więc w czasie gdy nie obserwowano już aktywacji kinazy mTOR. W przeciwieństwie do ketaminy cynk nie zmieniał ekspresji poziomu PSD95 w żadnym z badanych punktów czasowych (Szewczyk i wsp., 2015).

Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że podanie rapamycyny (inhibitor mTORC1), LY294002 (inhibitor PI3K), H-89 (inhibitor PKA) oraz GF109203X (inhibitor PKC) blokuje przeciwdepresyjny efekt cynku w FST u szczurów i blokuje wywołaną podaniem cynku aktywację szlaku mTOR (30min po podaniu cynku).

Podsumowanie. Otrzymane wyniki wskazują więc na zaangażowanie szlaków sygnalizacji komórkowej związanych z kinazami mTOR, PI3K, PKC i PKA w przeciwdepresyjnym mechanizmie działania cynku w FST oraz na udział cynku w aktywacji szlaków kinazy mTOR i p70S6K poprzez PI3K, PKC i PKA *in vivo*. Uzyskane dane pozwalają także wnioskować, że aktywność przeciwdepresyjna cynku jest związana z syntezą białek, takich jak BDNF, synapsyna I czy GluA1, które są zaangażowane w synaptogenezę oraz plastyczność synaptyczną.

4.2. Rola układu serotonergicznego i receptorów 5-HT1A w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku oraz rola cynku w modulacji funkcji receptora 5-HT1A

Przeprowadzone na myszach badania behawioralne wykazały, że cynk nasila działanie LPD z grupy SSRI w testach FST i TST u myszy (Szewczyk i wsp., 2002, Cunha i wsp., 2008). Wyniki uzyskane w tych eksperymentach stały się podstawą do rozpoczęcia kolejnych badań mających na celu wyjaśnienie roli układu serotonergicznego w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku. W pracy Szewczyk i wsp., (2009b) opisano efekt wspólnych podań cynku i citalopramu (selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny) oraz cynku i reboksetyny (selektywny i specyficzny inhibitor wychwytu noradrenaliny) w teście FST u myszy. Zaobserwowano, że cynk podawany łącznie z citalopramem (dawki nieaktywne w FST), podobnie jak we wcześniejszych badaniach (Szewczyk i wsp., 2002) znacząco zmniejszał czas bezruchu myszy. Pozytywny efekt zaobserwowano również po podaniu cynku i fluoksetyny (Szewczyk i wsp., 2009b). Natomiast łączne podanie cynku i reboksetyny nie wywoływało takiego efektu. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze dane o pozytywnym działaniu cynku w zwiększaniu efektywności działania LPD z grupy SSRI. W

celu dalszego potwierdzenia możliwego udziału transmisji serotonergicznej w przeciwdepresyjnym działaniu cynku, myszom podawano p-chlorofenyloalaninę (pCPA), która hamuje syntezę serotoniny. W doświadczeniu tym wykazano, że niedobór serotoniny blokuje działanie przeciwdepresyjne cynku w teście FST (Szewczyk i wsp., 2009b). Opisane powyżej wyniki sugerują więc, że suplementacja cynkiem poprawia skuteczność LPD, których mechanizm działania związany jest z wpływem na układ serotonergiczny oraz wskazują, że przeciwdepresyjne działanie cynku może być związane z modulacją neurotransmisji serotonergicznej. Co więcej, zaobserwowano, że podanie antagonisty receptora 5-HT1A - związku WAY100635 blokuje przeciwdepresyjne działanie cynku w FST (Szewczyk i wsp., 2009b). Dodatkowo Cichy i wsp., (2009) wykazali wzrost gęstości receptorów 5-HT1A w Hip szczurów po chronicznym podaniu cynku (14 dni) a Barrondo i Salles (2009) wykazali, że cynk może działać jako negatywny modulator allosteryczny receptora 5-HT1A. Opisane wyniki zasugerowały więc, że cynk może wpływać na transmisję serotonergiczną poprzez modulowanie funkcji receptorów 5-HT1A.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, postanowiono określić farmakologiczny profil działania cynku wobec receptorów 5-HT1A. Do badań wykorzystano powszechnie używane testy behawioralne, pozwalające na funkcjonalną charakterystykę (agonizm, antagonizm) oddziaływania związku z pre i postsynaptycznymi receptorami 5-HT1A. Zbadano efekt działania cynku w teście hipotermii u myszy i szczurów, teście opadania dolnej wargi (ang. lower lip retraction, LLR) oraz teście syndromu serotoninowego [efekt płaskiej postawy ciała (ang. flat body posture, FBP) i drgania przednich łap (ang. forepaw treading, FT)] u szczurów (Satała i wsp., 2016).

W przeprowadzonych przez nas badaniach cynk podawany w dawce 2 i 5mg Zn/kg znacząco obniżył temperaturę ciała myszy. Podobny efekt zaobserwowano po podaniu związku 8-OH-DPAT będącego agonistą receptora 5-HT1A. Zaobserwowano ponadto, że efekt hipotermii wywołany podaniem cynku był blokowany przez wcześniejsze podanie związku WAY-100635 - antagonisty receptora 5-HT1A. Hipotermia jest jednym z symptomów, których występowanie u myszy jest związane z aktywacją autoreceptorów 5-HT1A (Bill i wsp., 1991). W przeprowadzonych przez nas badaniach cynk podany w dawce 5mg Zn/kg masy ciała nie wpływał na obniżenie temperatury ciała u myszy pozbawionych autoreceptorów 5-HT1A, co potwierdza, że mechanizm wywoływania hipotermii przez cynk odbywa się drogą aktywacji autoreceptora 5-HT1A. Podanie cynku wpłynęło również na obniżenie temperatury ciała szczurów jednak efekt ten zaobserwowano po zastosowaniu większych dawek cynku (7.5 i 11.5 mg Zn/kg) niż te które były stosowane u myszy. Na

podstawie stanowiska, które dominuje w literaturze przedmiotu a które utrzymuje, że hipotermia obserwowana u szczurów spowodowana jest przede wszystkim aktywacją receptorów postsynaptycznych (Bill i wsp., 1991), można postawić hipotezę, że cynk w modelu hipotermii wykazuje cechy agonisty pre i postsynaptycznych receptorów 5-HT1A.

Innym testem funkcjonalnym *in vivo* stosowanym do scharakteryzowania farmakologicznego profilu działania związku wobec receptora 5-HT1A, jest test LLR. Efekt LLR obserwuje się po podaniu agonistów receptora 5-HT1A lub częściowych agonistów, wykazujących wysokie powinowactwo do tego receptora (Berendsen i wsp., 1989). Efekt ten jest natomiast blokowany przez podanie selektywnych antagonistów receptora 5-HT1A takich WAY10035 lub WAY100635. W naszych badaniach cynk podawany w dawce 2 i 5mg Zn/kg nie powodował LLR ale istotnie (podobnie jak WAY100635) i zależnie od dawki blokował LLR wywołany podaniem 8-OH-DPAT. Tak więc w teście LLR cynk wykazywał cechy antagonisty receptora 5-HT1A. Cynk nie wywoływał również tzw. „syndromu serotoninowego” (płaska postawa ciała i drżenie przednich łap), jednak w wyższych dawkach (7.5 i 11.5 mg Zn/kg) blokował te efekty wywołane podaniem 8-OH-DPAT. Uważa się, że wystąpienie syndromu serotoninowego odzwierciedla aktywację postsynaptycznych receptorów 5-HT1A tak więc w tym modelu cynk wykazał cechy postsynaptycznego antagonisty receptora 5-HT1A.

Druga część badań opisanych w pracy **Szewczyk i wsp. (2016)** miała na celu ocenę skuteczności działania cynku w FST u myszy dzikich oraz myszy pozbawionych autoreceptorów 5-HT1A. Badania te wykazały, że brak presynaptycznych receptorów 5-HT1A częściowo blokuje przeciwdepresyjny efekt działania cynku w FST u myszy co sugeruje, że presynaptyczne receptory 5-HT1A mogą być również zaangażowane w przeciwdepresyjny efekt wywołany podaniem cynku u myszy.

Zbadano ponadto wpływ podania antagonisty receptorów 5-HT1A (związku WAY 100635) oraz agonisty tych receptorów (8-OH-DPAT) na działanie cynku w FST u szczurów. Badania te wykazały, że WAY100635 blokuje działanie cynku w FST u szczurów. Natomiast jednoczesne podanie cynku i 8-OH-DPAT w dawkach nieaktywnych w FST powoduje skrócenie czasu bezruchu, co sugeruje, działanie synergistyczne obu związków w tym teście. Biorąc pod uwagę, że przeciwdepresyjne działanie związków w FST jest związane z aktywacją postsynaptycznych receptorów 5-HT1A (Assie i wsp., 2010) na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować o agonistycznym działaniu cynku wobec postsynaptycznych receptorów 5-HT1A.

Podsumowanie. Otrzymane z przeprowadzonych testów *in vivo* wyniki ujawniły zróżnicowany zależny od stężenia profil ago/antagonistyczny cynku w stosunku do receptora 5-HT1A. Wyniki badań *in vivo* wskazują ponadto, że cynk może modulować funkcję zarówno receptorów pre jak i postsynaptycznych. Zależne od stężenia działanie cynku w stosunku do receptorów 5-HT1A zostały potwierdzone w badaniach *in vitro*, których wyniki stanowią również część omawianej pracy. Stosując metodę wypierania znakowanego radioizotopowo liganda (selektywnego agonisty [³H]-8-OH-DPAT) z homogenatu tkankowego zawierającego receptory 5-HT1A (stabilna ekspresja w linii HEK293), wykazano, że cynk w niskich stężeniach potęguje a w wyższych hamuje wiązanie agonisty do receptora 5-HT1A i działanie to nosi cechy modulacji allosterycznej.

5. Wnioski

Badania postmortem

Szewczyk B, Albert PR, Burns AM, Czesak M, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Konick LC, Dieter L, Herbst N, May W, Rajkowska G, Stockmeier CA, Austin MC. *Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT1A receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder*. Int J Neuropsychopharmacol. 2009; 12(2):155-168.

- W badaniach postmortem wykazano obniżony poziom białek NUDR i 5-HT1A w PFC kobiet ze zdiagnozowaną depresją. Nie zaobserwowano natomiast zmian w poziomie obu białek w grupie mężczyzn z depresją w stosunku do odpowiedniej grupy kontrolnej.
- Obniżona ekspresja białka NUDR w PFC kobiet z depresją może odzwierciedlać zmiany funkcjonalne tego czynnika transkrypcyjnego i przyczyniać się do zmniejszenia poziomu receptorów 5-HT1A (efekt obserwowany u tych samych kobiet). Zależne od płci zmiany w poziomie białek NUDR i receptorów 5-HT1A w PFC mogą stanowić podstawowy mechanizm biologiczny związany z częstszym występowaniem depresji u kobiet.

Szewczyk B, Albert PR, Rogaeva A, Fitzgibbon H, May WL, Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Stockmeier CA, Woolverton WL, Kyle PB, Wang Z, Austin MC. *Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT1A receptor, in the prefrontal cortex of subjects with major depression*. Int J Neuropsychopharmacol. 2010;13(8):1089-1101.

- Badania postmortem wykazały obniżony poziom białka Freud-1 w PFC mężczyzn ze zdiagnozowaną depresją. Badania dotyczące wpływu wieku na obserwowane zmiany

wykazały istotną korelację pomiędzy poziomem białka Freud-1 a wiekiem pacjentów. Ekspresja tego białka była znacznie niższa w grupie młodszych pacjentów z depresją. Podobnie, poziom białka receptora 5-HT1A był znacznie niższy w tej grupie badanych.

- Zmniejszenie ekspresji białka Freud-1 u pacjentów z depresją może odzwierciedlać zaburzenie funkcji tego czynnika transkrypcyjnego i przyczyniać się podobnie jak NUDR do obserwowanych w depresji zmian w poziomie receptorów 5-HT1A.

Badania przedkliniczne

Szewczyk B, Kotarska K, Daigle M, Misztak P, Sowa-Kucma M, Rafało A, Curzytek K, Kubera M, Basta-Kaim A, Nowak G, Albert PR. *Stress-induced alterations in 5-HT1A receptor transcriptional modulators NUDR and Freud-1*. Int J Neuropsychopharmacol. 2014; 17(11):1763-1775.

- Zmiany w poziomie ekspresji genu i białka czynników transkrypcyjnych NUDR/Freud-1 oraz receptorów 5-HT1A są zróżnicowane w zależności od zastosowanego zwierzęcego modelu depresji.
- Zmniejszony poziom NUDR w PFC samców szczurów poddanych procedurze CMS oraz w PFC samic szczurów poddanych stresowi w czasie ciąży wskazuje na to, że stres może stanowić istotną przyczynę zmian w ekspresji tego czynnika. Co więcej wydaje się, że ważną rolę w regulacji ekspresji białka NUDR odgrywa wiek w którym zwierzęta były narażone na stres.
- Obniżony poziom NUDR zaobserwowany u samców szczurów poddanych procedurze CMS sugeruje, że zmiana ta w przypadku zwierząt nie jest zależna od płci.
- W modelach OB oraz PS zmiany w ekspresji receptora 5-HT1A są zależne od płci. OB powoduje spadek poziomu białka receptora 5-HT1A w PFC samców, podczas gdy PS obniża poziom 5-HT1A w PFC samic.

Szewczyk B, Pochwat B, Rafało A, Palucha-Poniewiera A, Domin H, Nowak G. *Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc*. Neuropharmacology. 2015; 99:517-26.

- Cynk podawany jednorazowo zwiększa poziom białka mTOR i p70S6K 30min i 3 godz. po podaniu, co koreluje z czasem w którym obserwowane jest jego przeciwdepresyjne działanie w FST.
- Cynk podawany jednorazowo zwiększa poziom białka BDNF, GluA1 oraz synapsyny I 3godz po podaniu. Podniesiony poziom białek GluA1 oraz synapsyny I jest

widoczny również 24 godz. po podaniu cynku czyli w czasie kiedy nie obserwuje się przeciwdepresyjnego efektu tego pierwiastka.

- Podanie inhibitora kinazy mTOR (rapamycyny), inhibitora kinazy PI3K (LY294002), inhibitora kinazy PKA (H-89), oraz inhibitora PKC (GF109203X) blokuje przeciwdepresyjny efekt cynku w FST u szczurów oraz odwraca wywołany podaniem cynku wzrost poziomu białek mTOR i p70S6K w PFC szczurów.
- Otrzymane wyniki dowodzą, że przeciwdepresyjne działanie cynku zależy od aktywacji kinazy mTOR oraz szlaków sygnalizacyjnych, które mogą pośrednio modulować funkcję tej kinazy.

Szewczyk B, Poleszak E, Wlaż P, Wróbel A, Blicharska E, Cichy A, Dybała M, Siwek A, Pomierny-Chamiło L, Piotrowska A, Brański P, Pilc A, Nowak G. *The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009; 33(2):323-329.

- Łączne podanie niskich nieaktywnych w teście FST dawek cynku i citalopramu ale nie cynku i reboksetyny wywołuje efekt przeciwdepresyjny u myszy.
- Przeciwdepresyjny efekt cynku w FST jest blokowany przez podanie inhibitora syntezy serotoniny (p-chlorofenyloalaniny, pCPA).
- Otrzymane wyniki wskazują na zaangażowanie systemu serotonergicznego w mechanizm przeciwdepresyjnego działania cynku obserwowanego w FST.

Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, Rafała A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, Tanaka KF, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, **Szewczyk B**. *Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT1A Receptors: In Vitro and In Vivo Studies*. Mol Neurobiol. 2016; 53(10):6869-688.

- Cynk obniża temperaturę ciała u szczurów i myszy. Takiego efektu nie zaobserwowano natomiast u myszy z nokautem genu autoreceptora 5-HT1A.
- Cynk nie wywołuje efektu LLR u szczurów oraz „syndromu serotoninowego” ale blokuje te efekty wywołane podaniem związku 8-OH-DPAT będącego agonistą receptora 5-HT1A.
- W teście FST cynk nasila efekt działania 8-OH-DPAT. Efekt cynku w FST jest natomiast blokowany po podaniu antagonisty receptora 5-HT1A. Nokaut autoreceptora 5-HT1A częściowo blokuje przeciwdepresyjny efekt cynku w FST.
- W testach funkcjonalnych *in vivo* cynk wykazuje cechy zarówno agonisty jak i antagonisty receptora 5-HT1A. Wyniki te znalazły potwierdzenie w badaniach

radioreceptorowych *in vitro* w których cynk w zależności od stężenia działa jako pozytywny modulator lub inhibitor receptorów 5-HT_{1A}. Wyniki badań *in vivo* wskazują ponadto, że cynk może modulować funkcję zarówno receptorów pre jak i postsynaptycznych.

Szewczyk B, Kubera M, Nowak G. *The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011; 35(3):693-701.

Praca ta podsumowuje zgromadzoną wiedzę na temat roli cynku w depresji, procesach starzenia się lub chorobach neurodegeneracyjnych, procesach, które często towarzyszą depresji. Część artykułu poświęcona jest również fizjologicznym i biochemicznym zmianom wywoływanym niedoborem cynku, a także możliwym mechanizmom działania przeciwdepresyjnego cynku.

6. Piśmiennictwo:

1. Albert PR, François BL (2010) Modifying 5-HT_{1A} Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. Front Neurosci 17;4:35
2. Albert PR, Le François B, Millar AM (2011) Transcriptional dysregulation of 5-HT_{1A} autoreceptors in mental illness. Mol Brain 27;4:21.
3. Albert PR, Lemonde S (2004) 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. Neuroscientist 10:575–593.
4. Altar CA (1999) Neurotrophins and depression. Trends Pharmacol Sci 20(2):59-61.
5. Ambrus L, Lindqvist D, Träskman-Bendz L, Westrin Å (2016) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity is associated with decreased brain-derived neurotrophic factor in female suicide attempters. Nord J Psychiatry 70(8):575-81.
6. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. J Proteome Res 5(1):196-201.
7. Artigas F (2015) Developments in the field of antidepressants, where do we go now? Eur Neuropsychopharmacol 25(5):657-70.
8. Assie MB, Bardin L, Auclair AL, Carilla-Durand E, Depoortere R, Koek W, Kleven MS, Colpaert F, Vacher B, Newman-Tancredi A (2010) F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT(1A) receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. Int J Neuropsychopharmacol 13:1285–1298.
9. Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. Nature. 2011 Jun 15;475(7354):91-5.
10. Barrondo S, Salles J (2009) Allosteric modulation of 5-HT(1A) receptors by zinc: binding studies. Neuropharmacology 56:455–462
11. Berendsen HH, Jenck F, Broekkamp CL (1989) Selective activation of 5HT_{1A} receptors induces lower lip retraction in the rat. Pharmacol Biochem Behav 33:821–827
12. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychiatry 47(4):351-4.
13. Best J, Nijhout HF, Reed M (2010) Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. Theor Biol Med Model 7: 34.

14. Bill DJ, Knight M, Forster EA, Fletcher A (1991) Direct evidence for an important species difference in the mechanism of 8-OH-DPAT-induced hypothermia. *Br J Pharmacol* 103(4):1857-64.
15. Cichy A, Sowa-Kućma M, Legutko B, Pomierny-Chamioło L, Siwek A, Piotrowska A, Szewczyk B, Poleszak E, Pilc A, Nowak G (2009) Zinc-induced adaptive changes in NMDA/glutamatergic and serotonergic receptors. *Pharmacol Rep* 61(6):1184-91.
16. Cieslik K. et al. (2007) Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats, *Pharmacol.Rep* 59, 46-52.
17. Cunha MP et al. (2008) Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(8):1913-20.
18. Czesak M, Le FB, Millar AM, Deria M, Daigle M, Visvader JE, Anisman H, Albert PR (2012) Increased serotonin-1A (5-HT_{1A}) autoreceptor expression and reduced raphe serotonin levels in deformed epidermal autoregulatory factor-1 (Deaf-1) gene knock-out mice. *J Biol Chem* 287:6615–6627.
19. Czesak M, Lemonde S, Peterson EA, Rogaeva A, Albert PR (2006) Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *J Neurosci* 26:1864–1871
20. Doboszevska U, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Pochwat B, Hołuj M, Ostachowicz B, Pilc A, Nowak G, Szewczyk B (2015a) Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 56:254-63.
21. Doboszevska U, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Rafała A, Ostachowicz B, Lankosz M, Nowak G (2015b) Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. *Behav Brain Res* 287:323-330
22. Donaldson Zr, Francois B, Santos TL, Almlı LM, Boldrini M, Champagne FA, Arango V, Mann JJ, Stockmeier CA, Galfalvy H, Albert PR, Ressler KJ and Hen R (2016) The functional serotonin 1a receptor promoter polymorphism, rs6295, is associated with psychiatric illness and differences in transcription *Transl Psychiatry* 6, e746;
23. Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59(12):1116-27.
24. Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJ, Vos T, Whiteford HA (2013) Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med.* 10(11):e1001547.
25. Franco JL, et al (2008) Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. *Behav Brain Res.* 9;188(2):316-23
26. Gong R, Park CS, Abbassi NR, Tang SJ (2006) Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281:18802-18815.
27. Hadjighassem MR, Austin MC, Szewczyk B, Daigle M, Stockmeier CA, Albert PR (2009) Human Freud-2/CC2D1B: a novel repressor of postsynaptic serotonin-1A receptor expression. *Biol Psychiatry* 66:214–222.
28. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N (1998) Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci* 16:209–216.
29. Hindmarch I (2001) Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. *Hum Psychopharmacol* 16(3):203-218.
30. Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33:67-75.

31. Huggenvik JI, Michelson RJ, Collard MW, Ziemba AJ, Gurley P, Mowen KA (1998) Characterization of a nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1)-related (NUDR) transcriptional regulator protein. *Mol Endocrinol* 12:1619–1639.
32. Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK (2004) Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull* 130:115–142.
33. Iyo AH, Kieran N, Chandran A, Albert PR, Wicks I, Bissette G, Austin MC (2009) Differential regulation of the serotonin 1A transcriptional modulators five prime repressor element under dual repression-1 and nuclear-deformed epidermal autoregulatory factor by chronic stress. *Neuroscience* 163:1119–1127.
34. Jacka FN, Maes M, Pasco JA, Williams LJ, Berk M (2012) Nutrient intakes and the common mental disorders in women. *J Affect Disord* 141(1):79-85.
35. Jensen JB, Jessop DS, Harbuz MS, Mørk A, Sánchez C, Mikkelsen JD (1999) Acute and long-term treatments with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram modulate the HPA axis activity at different levels in male rats. *J Neuroendocrinol* 11(6):465-71.
36. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Isumura N (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev.* 95(3):749-84.
37. Karol N, Brodski C, Bibi Y, Kaisman T, Forberg M, Hershinkel M, Sekler I, Silverman WF (2010) Zinc homeostatic proteins in the CNS are regulated by crosstalk between extracellular and intracellular zinc. *J Cell Physiol* 224(3):567-74.
38. Kieran N, Ou XM, Iyo AH (2010) Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 469:380-384
39. Koolschijn PC, van Haren NE, Lensvelt-Mulders GJ, Hulshoff Pol HE, Kahn RS (2009) Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 30(11):3719-35
40. Krystal JH, Sanacora G, Duman RS (2013) Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* 73(12):1133-41.
41. Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 23:8788–8799
42. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-964.
43. Lu Y, Wang C, Xue Z, Li C, Zhang J, Zhao X, Liu A, Wang Q, Zhou W (2014) PI3K/AKT/mTOR signaling-mediated neuropeptide VGF in the hippocampus of mice involve in the rapid onset antidepressant-like effects of GLYX-13. *Int J Neuropsychopharmacol* 25;18(5)
44. Maes M, D'Haese PC, Scharpe S, D'Hondt P, Cosyns P, De Broe ME (1994) Hypozincemia in depression. *J Affect Disord* 31:135-140
45. Maes M, Verkerk R, Vandoolaeghe E, Van Hunsel F, Neels H, Wauters A, Demedts P, Scharpé S (1997) Serotonin-immune interactions in major depression: lower serum tryptophan as a marker of an immune-inflammatory response. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 247(3):154-61.
46. Maes M, De Vos N, Demedts P, Wauters A, Neels H (1999) Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. *J Affect Disord* 56(2-3):189-94.

47. Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7(5):541-7.
48. Maserejian NN, Hall SA, McKinlay JB (2012) Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, in a population-based epidemiological survey. *J Affect Disord* 136(3):781-8
49. McLoughlin IJ, Hodge JS (1990) Zn in depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand* 82: 451-453
50. Miladinovic T, Nashed MG, Singh G (2015) Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. *Biomolecules* 5(4):3112-41.
51. Musazzi L, Racagni G, Popoli M (2011) Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem Int* 59(2):138-49.
52. Nowak G, Legutko B, Szewczyk B, Papp M, Sanak M, Pilc A (2004) Zinc treatment induces cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression. *Eur J Pharmacol.* 492(1):57-9.
53. Nowak G, Szewczyk B, Wieronska JM, Branski P, Palucha A, Pilc A, Sadlik K, Piekoszewski W (2003) Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull* 61:159-64.
54. Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, Bown CD, Goto A, Rogaeva A, Albert PR (2003) Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. *J Neurosci* 23:7415-7425.
55. Pochwat B, Palucha-Poniewiera A, Szewczyk B, Pilc A, Nowak G (2014) NMDA antagonists under investigation for the treatment of major depressive disorder. *Expert Opin Investig Drugs.* 23(9):1181-92
56. Rafała A, Sowa-Kucma M, Pochwat B, Nowak G, Szewczyk B (2016) Zinc deficiency and depression. *Nutritional Deficiency*. Ed. Erkekoglu P and Kocer-Gumusel B. InTech 2016.
57. Reddy MS (2010) Depression: the disorder and the burden. *Indian J Psychol Med.* 32(1):1-2.
58. Rogaeva A, Albert PR (2007) The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription. *Eur J Neurosci* 26(4):965-74.
59. Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62(1):63-77.
60. Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT1A receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88: 17-31.
61. Siwek M, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Morawska A, Piekoszewski W, Opoka W, Zieba A, Pilc A, Popik P, Nowak G (2010) Serum zinc level in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment. *J Affect Disord.* 2010 Nov;126(3):447-52.
62. Siwek M, Szewczyk B, Dudek D, Styczen K, Sowa-Kucma M, Mlyniec K, Siwek A, Witkowski L, Pochwat B, Nowak G (2013) Zinc as a marker of affective disorders. *Pharmacol Rep* 65:1512-1518.
63. Skolnick P (1999) Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 375(1-3):31-40.
64. Solati Z, Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Mahmoodianfard S, Gohari MR (2015) Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Nutr Neurosci* 18(4):162-8.
65. Sowa-Kućma M, Legutko B, Szewczyk B, Nowak K, Znojek P, Poleszak E, Papp M, Pilc A, Nowak G (2008) Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence. *J Neural Transm* 115(12):1621-1628.
66. Stahl SM (2008) *Stahl's Essential Psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications.* Cambridge University Press.
67. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4(2):141-94.

68. Szewczyk B (2013) Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci.* 5:33
69. Szewczyk B, Branski P, Wieronska JM, Palucha A, Pilc A, Nowak G (2002) Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. *Pol J Pharmacol* 54:681-685.
70. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućma M, Wróbel A, Słotwiński S, Listos J, Właż P, Cichy A, Siwek A, Dybała M, Gołembowska K, Pilc A, Nowak G (2010) The involvement of NMDA and AMPA receptors in the mechanism of antidepressant-like action of zinc in the forced swim test. *Amino Acids.* 2010 Jun;39(1):205-17.
71. Takeda A (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 34:137-148.
72. Takeda A (2010) Insight into Glutamate Excitotoxicity from Synaptic Zinc Homeostasis. *Int J Alzheimers Dis.* 2011: 491597.
73. Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol.* 185(1):1-10.
74. van Riezen H, Schnieden H, Wren A (1976) behavioral changes following olfactory bulbectomy in rats: a possible model for the detection of antidepressant drugs [proceedings]. *Br J Pharmacol* 57:426P-427P.
75. Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110.
76. Workman ER, Niere F, Raab-Graham KF (2013) mTORC1-dependent protein synthesis underlying rapid antidepressant effect requires GABABR signaling. *Neuropharmacology* 73:192- 203.
77. Wojcik J, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Grabowska M, Marcinek A, Florek E, Piekoszewski W, Nowak RJ, Opoka W, Nowak G (2006) Antepartum/postpartum depressive symptoms and serum zinc and magnesium levels. *Pharmacol.Rep* 58, 571-576.
78. Wróbel ZM, Marciniak M (2015) Ligandy receptora 5-HT_{1A} jako potencjalne leki przeciwdepresyjne. *Biul. Wydz. Farm. WUM,* 5, 28-39.
79. Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-864.
80. Zhou W, Wang N, Yang C, Li XM, Zhou ZQ, Yang JJ (2014) Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur Psychiatry.* 2014 Sep;29(7):419-23.
81. Zheng X, Liang Y, He Q, Yao R, Bao W, Bao L, Wang Y, Wang Z (2014) Current models of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation by growth factors and amino acids. *Int J Mol Sci* 15:20753-20769.

IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo- badawczych.

Moje zainteresowania naukowe od początku koncentrują się na badaniu przeciwdepresyjnych właściwości cynku oraz wyjaśnianiu mechanizmów zaangażowanych w ten efekt, początkowo z uwzględnieniem roli receptorów glutaminianergicznych a następnie receptorów serotoninerznych. Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących przeciwdepresyjnego działania magnezu jak i roli deficytu cynku w wywoływaniu symptomów depresji. Prowadzę ponadto badania dotyczące zaangażowania białek regulujących poziom cynku wewnątrzkomórkowego w etiologii depresji.

A) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Aktywność przeciwdepresyjna cynku

W 1990 roku Trullas i Skolnik opublikowali wyniki badań w których dowiedli, że antagoniści receptora NMDA wykazują aktywność przeciwdepresyjną w testach przesiewowych i modelach depresji. Te dane skłoniły nas do rozpoczęcia badań, które miały wyjaśnić czy cynk, który jest endogennym inhibitorem receptora NMDA również posiada przeciwdepresyjne własności. Pierwsze eksperymenty wykonane w naszym laboratorium pokazały przeciwdepresyjną aktywność cynku w teście FST u myszy (Krocza i wsp., 2000). Kolejne badania wykazały aktywność przeciwdepresyjną cynku w modelu usunięcia opuszek węchowych i chronicznego łagodnego stresu u szczurów (Krocza i wsp., 2001; Nowak i wsp., 2003; Sowa-Kućma i wsp., 2008 odpowiednio). Co więcej badania te ujawniły, że cynk nie tylko wywołuje działanie przeciwdepresyjne ale także nasila działanie klasycznych leków przeciwdepresyjnych. Niskie, nieaktywne dawki imipraminy czy citalopramu, podawane wspólnie z niskimi nieefektywnymi dawkami cynku wywoływały efekt przeciwdepresyjny w FST u myszy (Szewczyk i wsp., 2002).

Krocza B*, Zieba A, Dudek D, Pilc A, Nowak G: Zinc exhibits an antidepressant-like effect in the forced swimming test in mice. *Pol J Pharmacol*, 2000, 52(5), 403-406 (IF=0.456; KBN/MNiSW=7).

Krocza B*, Branski P, Pałucha A, Pilc A, Nowak G: Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. *Brain Res Bull*, 2001, 55(2), 297-300 (IF=1.783; KBN/MNiSW=10).

Nowak G, **Szewczyk B**, Wieronska JM, Branski P, Pałucha A, Pilc A, Sadlik K, Piekoszewski W. Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull*. 2003;61(2):159-164 (IF=2.609; KBN/MNiSW=12).

Sowa-Kućma M, Legutko B, **Szewczyk B**, Novak K, Znojek P, Poleszak E, Papp M, Pilc A, Nowak G. Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence. *J Neural Transm*. 2008;115(12):1621-1628 (IF=2.514; KBN/MNiSW=20).

Szewczyk B, Brański P, Wierońska JM, Pałucha A, Pilc A, Nowak G: Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. *Pol J Pharmacol*, 2002, 54:681-685 (IF=0.684; KBN/MNiSW=8).

*Nazwisko panięskie

Udział receptora NMDA w przeciwdepresyjnym działaniu cynku

Cynk jest inhibitorem receptora NMDA a badania przeprowadzone w naszym laboratorium dowiodły że, właśnie hamowanie funkcji tego receptora stanowi jeden z podstawowych mechanizmów jego przeciwdepresyjnego działania. Wykazano, że aktywacja receptorów NMDA poprzez podanie kwasu N-metylo-D-asparaginowego lub D-seryny (agonista miejsca glicynowego w kompleksie receptora NMDA) blokuje przeciwdepresyjne działanie cynku u myszy w FST (Poleszak i wsp., 2008, Szewczyk i wsp., 2010). Co więcej wykazano, że wspólne podania antagonistów receptora NMDA (CGP 37849, L-701,324, D-cykloseryny i MK-801) oraz cynku w niskich nie aktywnych w FST dawkach wywołuje efekt przeciwdepresyjny w tym teście.

Poleszak E, Szewczyk B, Właż A, Fidecka S, Właż P, Pilc A, Nowak G. *D-serine, a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant-like effects of magnesium and zinc in mice.* Pharmacol Rep. 2008; 60(6):996-1000 (IF=2.167; KBN/MNiSW=10).

Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućma M, Wróbel A, Słotwiński S, Listos J, Właż P, Cichy A, Siwek A, Dybała M, Gołombiowska K, Pilc A, Nowak G. *The involvement of NMDA and AMPA receptors in the mechanism of antidepressant-like action of zinc in the forced swim test.* Amino Acids. 2010;39(1):205-217 (IF=4.106; KBN/MNiSW=27).

Przeciwdepresyjne działanie magnezu w modelu chronicznego łagodnego stresu oraz modelu usunięcia opuszek węchowych

Magnez jest jednym z najważniejszych pierwiastków w ludzkim organizmie, zaangażowanym w wiele procesów fizjologicznych między innymi w modulację transmisji synaptycznej. Blokowanie receptora NMDA jest jedną z kluczowych funkcji magnezu w OUN. Jak pokazały wyniki badań klinicznych, wielu pacjentów z chorobami psychicznymi wykazuje zmieniony poziom magnezu w osoczu (Cheungpasitporn et al., 2015). Badania przedkliniczne z kolei wskazały na przeciwdepresyjne własności magnezu oraz dowiodły, że deficyt tego pierwiastka wywołuje pro-depresyjne i pro-lękowe zachowania u zwierząt (Serefko i wsp., 2013). W naszym laboratorium również wykazaliśmy przeciwdepresyjny efekt magnezu w modelu chronicznego łagodnego stresu oraz modelu usunięcia opuszek węchowych u szczurów (Pochwat et al., 2014; 2015). Dodatkowo, wyniki przeprowadzonych przez nas badań biochemicznych wskazały na zaangażowanie ścieżki NMDA/AMPA/BDNF w mechanizm przeciwdepresyjnego działania magnezu (Pochwat et al., 2014; 2015).

Pochwat B, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Siwek A, Doboszevska U, Piekoszewski W, Gruca P, Papp M, Nowak G. *Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild*

stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. Int J Neuropsychopharmacol. 2014;17(3):393-405 (IF=4.009; KBN/MNiSW=40).

Pochwat B, Sowa-Kucma M, Kotarska K, Misztak P, Nowak G, **Szewczyk B**. *Antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model is associated with the AMPA/BDNF pathway*. Psychopharmacology (Berl). 2015;232(2):355-367 (IF=3.540; KBN/MNiSW=35).

Deficyt cynku jako model depresji

Deficyt cynku wywołuje wiele niekorzystnych efektów zarówno somatycznych jak i neurologicznych. Wyniki badań klinicznych sugerują, że niedobory cynku w diecie zwiększają ryzyko wystąpienia zaburzeń depresyjnych. Również dane badań przedklinicznych wskazują na istotną rolę deficytu cynku w wywoływaniu zachowań przypominających symptomy depresji. W naszym laboratorium prowadzono badania mające na celu zweryfikowanie czy eksperymentalnie wywołany deficyt cynku (poprzez stosowanie diety o niskiej zawartości cynku) może znaleźć zastosowanie jako zwierzęcy model depresji. Wyniki tych badań, opisane w pracy Doboszevska i wsp., (2015a) pokazały, że stosowanie u szczurów diety z niską zawartością cynku przez okres 4 do 6 tygodni prowadzi do wywołania zachowań określanych jako pro-depresyjne w FST; zmniejsza spożycie roztworu cukru (symptom przypominający anhedonię u ludzi) oraz wywołuje zaburzenia interakcji społecznych. Co więcej wykazano, że zmiany behawioralne są skorelowane ze zmianami biochemicznymi, wskazującymi na zaburzenia w transmisji glutaminianergicznej. Deficyt cynku zwiększa ekspresję podjednostek receptora NMDA (GluN2A i GluN2B) w Hip oraz zmniejsza poziom PSD-95, p-CREB, BDNF (zmiany opisywane również w depresji). Zmiany behawioralne wywoływane deficytem cynku, obserwowane w FST były odwracane przez fluoksetynę (SSRI) (Doboszevska i wsp., 2015b).

Doboszevska U, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Pochwat B, Hołuj M, Ostachowicz B, Pilc A, Nowak G, **Szewczyk B**. *Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2015a 56:254-263 (IF=4.361; KBN/MNiSW=35).

Doboszevska U, **Szewczyk B**, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Rafało A, Ostachowicz B, Lankosz M, Nowak G. *Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex*. Behav Brain Res. 2015b;287:323-330 (IF=3.002; KBN/MNiSW=30).

Rola białek odpowiedzialnych za homeostazę cynku w patofizjologii i leczeniu depresji.

Jak wspomniano powyżej cynk odgrywa istotną rolę w wielu procesach zachodzących w organizmie stąd utrzymanie stężenia cynku na ściśle określonym poziomie jest niezwykle istotne. Za utrzymanie homeostazy cynku w mózgu odpowiadają wyspecjalizowane białka, do których należą m. in. transportery cynku z rodziny ZnT (Kambe i wsp., 2015). Białka te regulują poziom cynku wewnątrzkomórkowego poprzez usuwanie jego nadmiaru do przestrzeni synaptycznej lub transport do wewnątrzkomórkowych pęcherzyków. Nasze badania postmortem wykazały wzrost poziomu białka transporterów ZnT1, 4 i ZnT5 oraz spadek ZnT3 w PFC osób ze zdiagnozowaną depresją. Podobne zmiany zaobserwowaliśmy również w PFC samobójców. Nasz zespół otrzymał więc wyniki wskazujące na udział zmian w poziomie białek ZnT w patofizjologii depresji (Rafało-Ulińska i wsp., 2016).

Rafało-Ulińska A, Piotrowska J, Kryczyk A, Opoka W, Sowa-Kucma M, Misztak P, Rajkowska G, Stockmeier CA, Datka W, Nowak G, **Szewczyk B.** *Zinc transporters protein level in postmortem brain of depressed subjects and suicide victims.* J Psychiatr Res. 2016 83:220-229 (IF=4.465; KBN/MNiSW=35).

Piśmiennictwo:

1. Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, Mao MA, Srivali N, Ungprasert P, Varothai N, Sanguankeo A, Kittanamongkolchai W, Erickson SB (2015) Hypomagnesaemia linked to depression: a systematic review and meta-analysis. Intern Med J. 45(4):436-40.
2. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):749-84.
3. Serefko A, Szopa A, Wlaź P, Nowak G, Radziwoń-Zaleska M, Skalski M, Poleszak E (2013) Magnesium in depression. *Pharmacol Rep.* 2013;65(3):547-54. Review.
4. Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol.* 185(1):1-10.

B) Współpraca z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą

Jednostki zagraniczne:

- Ottawa Hospital Research Institute (Neuroscience), Ulm University, Kanada – realizacja wspólnego grantu NCN, Harmonia 4.
- Department of Psychiatry and Human Behavior, University of Mississippi Medical Centre, Jackson Mississippi, USA – współpraca w zakresie badań z wykorzystaniem tkanki postmortem.
- WG Cellular Neurobiology and Neuro-Nanotechnology, Dept. of Biological Sciences, School of Natural Sciences, University of Limerick, Irlandia (wcześniej Department of Anatomy and Cell Biology, Ulm University, Niemcy) - współpraca w zakresie badań dotyczących oznaczania poziomu cynku wewnątrzkomórkowego oraz synaptycznego.

Jednostki krajowe:

- Klinika Psychiatrii Dorosłych, Krakowski Szpital Uniwersytecki – współpraca w zakresie badań dotyczących określenia roli cynku jako markera depresji.
- Katedra Farmakobiologii, Wydział Farmaceutyczny CMUJ – współpraca w zakresie immunohistochemicznego obrazowania zmian w rozmieszczeniu transporterów cynkowych w mózgu.
- Zakład Chemii Nieorganicznej Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny CMUJ – współpraca w zakresie oznaczania stężenia cynku w tkance mózgowej.
- Wydział Chemii UJ – współpraca w zakresie badań dotyczących obrazowania metali w strukturach mózgu.
- Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie – współpraca w zakresie oceny aktywności przeciwdepresyjnej ligandów receptora NMDA.
- Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie – współpraca w zakresie oznaczania stężenia cynku w tkance mózgowej oraz surowicy.

C) Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

Kierownik:

2013-2017 - NCN 2013/08/M/NZ7/00518 „Rola receptora 5-HT1A w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania cynku”. Narodowe Centrum Nauki - Harmonia 4.

2012- 2015 - POMOST/2012-6/12 „Involvement of ZnT-1, ZnT-3, ZnT-4, ZnT-5, ZnT-6 and MT-3 in the pathophysiology and treatment of depression”. Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej.

2000-2001 - KBN Nr 4P05A 105 19 „Wpływ wielokrotnych podań leków przeciwdepresyjnych i elektrowstrząsów na powinowactwo Zn do kompleksu receptora NMDA”. Komitet Badań Naukowych.

Wykonawca:

2016-2019 - NCN 2015/19/ B/NZ4/01890 „Rola wybranych szlaków przekazywania sygnału w deficycie cynku”. Narodowe Centrum Nauki - OPUS 10.

2013-2017 - ERA-NET-NEURON/11/2014. “Analogi hyperforyny, cynk i kanały TRPC6 - nowy koncept leku przeciwdepresyjnego”. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju;

2010-2014 - POIG.01.01.02-12-004/09-00. „Depresja-mechanizmy-terapia”. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

2009-2011 - PNRF-103-AI-1/07. „Stworzenie platformy do poszukiwania związków działających na układy serotonergiczny i glutaminianergiczny jako potencjalnych leków przeciwdepresyjnych i przeciwłękowych”. Norweski Mechanizm Finansowy w ramach Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych

2006-2007 - R03AA015996 “Integrity of the Dorsal Raphe Serotonin System in Alcohol Dependence and Suicide”. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. USA

2006-2007 P50MH060451 Conte Center for the Neuroscience of Depression. National Institute of Mental Health, USA.

2005-2006 - P20RR017701 COBRE: Center of Biomedical Research Excellence in Psychiatric Neuroscience. USA

D) Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową

2016 - Nagroda International Rising Talents - Fundacja Loreal

2015 - Stypendium habilitacyjne – Fundacja Loreal

2014-2017 - Coroczna nagroda w programie „Quantitas” i „Qualitas” przyznawana z funduszu KNOW za prace naukowe opublikowane w roku 2013-2016 przez autorów zatrudnionych w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie.

2013 -11th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP); Kyoto - Stypendium Konferencyjne dla młodych Naukowców

2006 - Society for Neuroscience - Stypendium Konferencyjne;

2003-2004 – stypendium Start Fundacja na rzecz Nauki Polskiej- (stypendia dla młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań).

2002 - Nagroda Fundacji J.J. Supniewskich za całokształt działalności naukowej w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie.

E) Referaty i wykłady wygłoszone na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

2013 - „Complex agonistic/antagonistic 5-HT1A receptor activity of zinc” - 11th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP), 23-27.06.2013, Kyoto, Japonia;

2012 - ” Zinc as a marker of depression” - 18th International Esperanto Medical Congress: “Depression - threat of 21st century”; 10-15.07.2012, Opava, Czechy;

2012 - “Serum zinc as a new possible marker for depression”- University of Mississippi Medical Center, Department of Psychiatry and Human Behavior Grand Rounds; 12.X. 2012, Jackson MS, USA;

2011 - "The role of zinc and zinc deficiency in depression and neurodegeneration" - 10th World Congress of Biological Psychiatry 29.05-02.06 2011; Praga, Czechy;

2011 - "Role of zinc ion availability in neurodegenerative pathways in depression" - EPS Xi'an International Medical Symposium 2011, 17-19.06.2011, Xian, Shanxi Province, Chiny;

F) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych:

W latach 2011-2016 byłam autorem 19 recenzji artykułów naukowych dla czasopism z listy filadelfijskiej (BioMed Research International; Brain Research Bulletin; Cellular and Molecular Neurobiology; Inorganica Chimica Acta; Journal of Affective Disorders; Neuroscience & Biobehavioral Reviews; Neuroscience Letters; Nutritional Neuroscience; Pharmacological Reports; Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry; Psychopharmacology; Science Advances)

G) Staż w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

15-21 luty 2016 - Institute for Anatomy and Cell Biology, Ulm University, Ulm, Niemcy (staż szkoleniowy z zakresu metod oznaczania poziomu cynku wewnątrzkomórkowego oraz synaptycznego);

7 wrzesień - 2 październik 2015 - Ottawa Hospital Research Institute; Ottawa, Kanada (staż badawczy w ramach realizacji grantu Harmonia (oznaczenia poziomu cAMP z wykorzystaniem hodowli komórkowych);

7 lipiec - 23 sierpień 2014 - Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Kanada (staż badawczy w ramach realizacji grantu Harmonia (NCN) - eksperymenty behawioralne z wykorzystaniem myszy knockout z usuniętym genem autoreceptora 5-HT1A);

2005-2007 – staż podoktorski, University of Mississippi Medical Center, Jackson MS Department of Psychiatry, USA

H) Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studenckimi

- byłam opiekunem naukowym dwóch doświadczalnych prac magisterskich wykonywanych przez studentów kierunku farmacji oraz neurobiologii UJ w Krakowie.

- byłam promotorem pomocniczym jednej pracy doktorskiej wykonywanej przez doktoranta kierunku farmacji CMUJ w Krakowie,

- nadzorowałam również wykonywanie eksperymentów w ramach realizacji prac magisterskich przez dwie studentki kierunku neurobiologii UJ.

I) Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje:

- 76 prac oryginalnych i 11 prac przeglądowych posiadających Impact Factor;

- 5 rozdziałów w książkach;

- 36 prezentacji posterowych na konferencjach międzynarodowych i 23 na konferencjach krajowych;

Sumaryczny impact factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **IF=235.525**, co stanowi **1934** punktów KBN/MNiSW

Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy Web of Science (WoS): **2038**

Indeks Hirscha publikacji według bazy Web of Science (WoS): **29**

B. Szewczyk