

Załącznik nr 3

Agnieszka Chocyk

Autoreferat

**Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu
Zakład Farmakologii
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie**

Kraków 2014

Spis treści

1–3. Dane o posiadanych dyplomach i zatrudnieniu	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	3
4a. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4b. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
4c. I. Wprowadzenie	5
4c. II. Wpływ MS na dojrzewanie układu dopaminowego	8
4c. IIa. ELS a funkcjonowanie i rozwój układu dopaminowego – dostępne dane literaturowe	8
4c. IIb. Wpływ MS na dojrzewanie układu dopaminowego – opis wyników	11
4c. IIc. Wpływ MS na procesy dojrzewania układu dopaminowego – implikacje funkcjonalne	14
4c. III. Wpływ MS na procesy strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w przyśrodkowej części kory przedczołowej (mPFC)	16
4c. IIIa. Rola mPFC w patofizjologii zaburzeń nastroju i lękowych – znaczenie ELS w etiologii	16
4c. IIIb. Wpływ MS na procesy strukturalne i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w mPFC – opis wyników	18
4c. IIIc. Wpływ MS na procesy plastyczności synaptycznej w mPFC – implikacje funkcjonalne	19
4c. IV. Wpływ MS na zachowania lękowe	20
4c. V. Znaczenie badań i ich ewentualne wykorzystanie	22
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	28
5a. Autorstwo/współautorstwo w publikacjach naukowych	28
5b. Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w takich projektach	29
5c. Nagrody za działalność naukową	29
5d. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych	30
5e. Przebieg pracy naukowej – kluczowe etapy	30

1. Imię i Nazwisko.

Agnieszka Chocyk

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

- Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu, Instytut Farmakologii PAN, Kraków – luty 2005,
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola wybranych receptorów dopaminowych w regulacji aktywności neuronów jądra przykomorowego podwzgórza”
- Magister biologii, Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków – wrzesień 1996

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- Adiunkt, Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków: styczeń 2006 – obecnie
- Asystent, Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków: styczeń 1998 – grudzień 2005
- Pracownik inżynierjno-techniczny, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków: styczeń 1997 – grudzień 1997

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Osiągnięciem naukowym poddanym ocenie jest cykl sześciu prac opublikowanych w latach 2010-2014 i dotyczących **wpływu stresu we wczesnym okresie życia na dojrzewanie i funkcjonowanie mózgu ze szczególnym uwzględnieniem struktur mózgowych powiązanych z układem dopaminowym.**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

Chocyk A., Przyborowska A., Makuch W., Majcher-Maślanka I., Dudys D., Wędzony K. The effects of early-life adversity on fear memories in adolescent rats and their persistence into adulthood. **(2014)** Behav. Brain Res., 264C: 161-172. **(IF: 3.327; MNiSW: 30)**

Chocyk A., Majcher-Maślanka I., Dudys D., Przyborowska A., Wędzony K. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions - a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. **(2013)** Pharmacol. Rep., 65: 1462-1470. **(IF: 1.965; MNiSW: 25)**

Chocyk A., Bobula B., Dudys D., Przyborowska A., Majcher-Maślanka I., Hess G., Wędzony K. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. **(2013)** Eur. J. Neurosci., 38: 2089-2107. **(IF: 3.753; MNiSW: 30)**

Chocyk A., Przyborowska A., Dudys D., Majcher I., Maćkowiak M., Wędzony K. The impact of maternal separation on the number of tyrosine hydroxylase-expressing midbrain neurons during different stages of ontogenesis. **(2011)** Neuroscience, 182: 43-61. **(IF: 3.38; MNiSW: 27)**

Chocyk A., Dudys D., Przyborowska A., Majcher I., Maćkowiak M., Wędzony K. Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. **(2011)** Neuroscience, 173: 1-18. **(IF: 3.38; MNiSW: 27)**

Chocyk A., Dudys D., Przyborowska A., Maćkowiak M., Wędzony K. Impact of maternal separation on neural cell adhesion molecules expression in dopaminergic brain

regions of juvenile, adolescent and adult rats. (2010) *Pharmacol. Rep.*, 62: 1218-1224.
(IF: 2.5; MNiSW: 27)

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

I. Wprowadzenie

Liczne badania epidemiologiczne ostatniej dekady koncentrowały się na poszukiwaniu związków pomiędzy stresem, czy też traumatycznymi zdarzeniami zaistniałymi we wczesnym okresie życia osobnika, (z ang. *early-life stress*, ELS) a występowaniem chorób psychicznych w życiu późniejszym (Teicher et al., 2003; Andersen & Teicher, 2008; Andersen & Teicher, 2009; Green et al., 2010). Zgromadzone dane wskazują jednoznacznie, że ELS zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń nastroju, stanów lękowych, zaburzeń zachowania oraz nadużywania substancji psychoaktywnych (Andersen & Teicher, 2008; Andersen & Teicher, 2009; Green et al., 2010; Kessler et al., 2010). Przykładowo, w 2010 roku opublikowano wyniki przeprowadzonych na szeroką skalę badań na ogółem ponad pięćdziesięciotysięcznej populacji dorosłych pochodzących z 21 krajów o różnym statusie ekonomicznym (WHO World Mental Health Surveys), które pokazują, że ELS zwiększa ryzyko wystąpienia pierwszego epizodu wyżej wspomnianych zaburzeń psychicznych. Oszacowano również, że ELS może być odpowiedzialny za 41.6% przypadków zaburzeń zachowania, 31.0% zaburzeń lękowych, 27.5% przypadków nadużywania różnych substancji i 22.9% zaburzeń nastroju (Kessler et al., 2010). Co więcej, ELS zwiększa ryzyko wystąpienia epizodów choroby psychicznej we wczesnym okresie życia. Wykazano bowiem, że ELS może być odpowiedzialny za ogółem 38.2% przypadków wspomnianych psychopatologii ujawnianych w dzieciństwie (w wieku od 4 do 12 lat), 32.3% przypadków pojawiających się w okresie adolescencji oraz za 29.0 i 21.8% psychopatologii odpowiednio w okresie wczesnej dorosłości (20-29 lat) i późnej dorosłości (wiek powyżej 30 lat) (Kessler et al., 2010). W patofizjologii wielu wymienionych powyżej schorzeń psychicznych, których ryzyko wystąpienia łącznie jest z działaniem ELS, wyróżnia się zaburzenia w funkcjonowaniu określonych szlaków neurotransmisyjnych układu dopaminowego i związanych z nim struktur mózgowych.

(Schultz, 2007; Van den Heuvel & Pasterkamp, 2008). Na szczególne podkreślenie zasługują nieprawidłowości w działaniu szlaku meзокortykolimbicznego, mającego swój początek w polu brzusznej nakrywki (jądra A10, VTA) i unerwiającego liczne struktury mózgowe, takie jak jądro półleżące przegrody (brzuszne prążkowie), jądra migdałowe, korę przedczołową czy przegrodę. Szlak ten odgrywa ważną rolę w regulacji zachowań emocjonalnych (w tym lękowych), w powstawaniu uzależnień, zaburzeń nastroju i zachowania, a także w procesach motywacyjnych i uczeniu się. Natomiast, szlak nigrostriatalny, rozpoczynający się w istocie czarnej (jądra A9, SN) i dochodzący do grzbietowego prążkowie (jądro ogoniaste, skorupa), zaangażowany jest w procesy planowania i programowania ruchu, w zachowania zorientowane na cel, tworzenie nawyków - zatem zaburzenia w jego funkcjonowaniu mogą wiązać się z rozwojem i utrzymywaniem się zachowań kompulsywnych towarzyszących uzależnieniom (Schultz, 2007; Van den Heuvel & Pasterkamp, 2008).

Dzięki rozwojowi metod obrazowania mózgu, w ostatnich latach możliwym stało się przeprowadzenie badań klinicznych, szukających związku pomiędzy ELS a zmianami w funkcjonowaniu układu dopaminowego u ludzi (Dillon et al., 2009; Pruessner et al., 2004). Przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) wykazano na przykład zależność między jakością opieki rodzicielskiej a poziomem uwalniania dopaminy pod wpływem stresu psychosocjalnego w brzusznej prążkowie u młodych dorosłych (w wieku 18-30 lat) (Pruessner et al., 2004). W szczególności stwierdzono, iż osoby odczuwające niską jakość opieki rodzicielskiej we wczesnym okresie życia wykazywały zwiększone uwalnianie dopaminy w badanym obszarze mózgu (Pruessner et al., 2004). Podobnie, inne badania pokazują pozytywną asocjację pomiędzy intensywnością doświadczeń ELS a poziomem uwalniania dopaminy w brzusznej prążkowie w odpowiedzi na podanie amfetaminy (Oswald et al., 2014). Kolejne badania, tym razem wykorzystujące technikę funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI), pokazały, że osoby maltretowane w dzieciństwie i ujawniające symptomy anhedonii i depresji w życiu dorosłym, wykazują słabszą odpowiedź funkcjonalną mózgu na czynniki nagradzające, specyficznym na poziomie lewej skorupy (*putamen*) i gałki bladej (*pallidus*) (Dillon et al., 2009). Powyższe dane kliniczne mogą sugerować, że ELS, interferuje z rozwojem i dojrzewaniem mózgu przez co może prowadzić do powstania zaburzeń czy chorób psychicznych. Przeprowadzenie gruntownej weryfikacji tej hipotezy możliwe jest jedynie dzięki badaniom przedklinicznym, w zwierzęcych modelach ELS.

Modelowanie traumatycznych, stresujących doświadczeń wczesnego okresu życia (ELS) ma długą historię. Rozpoczęły ją prace Levine i wsp. w latach 60-tych prowadzone na gryzoniach (Levine et al., 1956). Badano w nich wpływ awersyjnego bodźca elektrycznego podanego młodym zwierzętom (foot shock) na ich reakcje behawioralne w późniejszym życiu (Levine et al., 1956). Od tamtej pory rozwinięto i wdrożono rozliczne procedury zwierzęce modelujące ELS (Cirulli et al., 2009; Pryce et al., 2002). Ze względu na okres rozwojowy, w którym wprowadza się czynnik stresu można podzielić je na: (a) interwencje w okresie prenatalnym (np., stres unieruchomienia czy podanie lipopolisacharydu (LPS) zastosowane wobec ciężarnych samic), (b) interwencje w okresie neonatalnym, od momentu urodzenia aż do odłączenia młodych od matki (w przypadku szczurów do 21 dnia życia, np., separacja osesków od matki, z ang. *maternal separation*: MS), (c) interwencje w okresie młodzieńczym, po odstawieniu młodych od matki aż do dorosłości (np., izolacja socjalna, z ang. *isolation rearing*) (Cirulli et al., 2009; Pryce et al., 2002). Interwencje eksperymentalne w okresie neonatalnym u gryzoni cieszą się szczególną popularnością wśród badaczy, także wśród tych poszukujących związków pomiędzy ELS a dysfunkcjami układu dopaminowego (Brake et al., 2004; Chocyk et al., 2011b; Kikusui et al., 2005; Kosten et al., 2005; Matthews et al., 1999; Moffett et al., 2006; Moffett et al., 2007; Ploj et al., 2003). Procedury te modelują bowiem ELS w okresie okołourodzeniowym i dziecięcym (w odniesieniu do stopnia rozwoju ludzkiego), zatem w miarę dobrze oddają przypadki ELS u człowieka. Wśród procedur modelujących ELS w okresie neonatalnym powszechnie stosowaną jest separacja osesków od matki (MS), przeprowadzana najczęściej pomiędzy postnatalnym dniem (PND) 1 a PND 14 w wielu wariantach, od jednorazowej MS (24-ro godzinnej), po wielokrotną (1-6 godzin dziennie), stosowaną codziennie przez pierwsze dwa tygodnie życia szczurów lub tylko przez kilka wybranych dni (Cirulli et al., 2009; Pryce et al., 2002). Dodatkowym wariantem proceduralnym może być oddzielanie zwierząt tylko od matki (cały miot umieszczany jest razem w jednym pudełku izolacyjnym) lub separacja również od rodzeństwa (oddzielanie indywidualnych osobników). Ten ostatni wariant MS w literaturze określany jest często, jako, z ang., *neonatal isolation* (Kosten et al., 2005; McCormick et al., 1998). Odrębną i dyskutowaną już od dekad kwestią związaną z procedurami MS jest dobór właściwej grupy kontrolnej. Początkowo jako kontrolę do MS najczęściej stosowano grupę zwierząt, która nie miała bezpośredniego kontaktu z człowiekiem przez pierwsze tygodnie życia (z ang. *non-handled*, NH) (McCormick et al., 1998;

Meaney et al., 2002). Inny typ grupy kontrolnej stanowiły często zwierzęta podlegające krótkiej (1-15 min) separacji od matek, czyli tzw., handlingowi (*early handling*) (Francis et al., 2002; Giachino et al., 2007). Wobec kumulujących się z biegiem czasu danych wskazujących, że praktycznie każdy typ interwencji we wczesnym okresie życia nie jest obojętny i wpływa kształtująco na późniejsze zachowanie zwierząt, zaczęto rozważać konieczność standaryzacji hodowli zwierząt we wczesnych okresach życia i stosowania najbardziej neutralnych metod kontaktu z nimi (Francis et al., 2002; Giachino et al., 2007; Lehmann et al., 2002; Macri et al., 2004; Vazquez et al., 2006). Obecnie najczęściej stosowaną grupą kontrolną do procedur MS są zwierzęta mające pewien regularny, choć niewielki, kontakt z eksperymentatorem, najczęściej raz w tygodniu w trakcie czyszczenia klatki; jest to tzw., grupa zwierząt (z ang.) *animal facility-reared: AFR* (Chocyk et al., 2010; Chocyk et al., 2011b; Faure et al., 2009; Hulshof et al., 2011; O'Malley et al., 2010).

Wyżej opisane przesłanki naukowe jak również zainteresowanie modelowaniem ELS skłoniły mnie do włączenia się w nurt badań nad wpływem ELS na dojrzewanie i funkcjonowanie mózgu. W cyklu prac stanowiących moje osiągnięcie naukowe do modelowania ELS wykorzystywana była procedura wielokrotnej MS, polegająca na codziennej, 3-godzinnej (9.00 – 12.00) separacji całych miotów szczurzych od matek, począwszy od PND 1 aż do PND 14. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta AFR. Badaniom przyświecały trzy główne cele:

- Określenie wpływu MS na dojrzewanie układu dopaminowego
- Zbadanie czy MS interferuje z naturalnie przebiegającymi procesami strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w przyśrodkowej części kory przedczołowej (z ang. *medial prefrontal cortex*, mPFC)
- Analiza wpływu MS na zachowania lękowe regulowane przez mPFC

II. Wpływ MS na dojrzewanie układu dopaminowego

Ila. ELS a funkcjonowanie i rozwój układu dopaminowego – dostępne dane literaturowe

Licznie zgromadzone dane literaturowe wskazują na istnienie funkcjonalnej nadwrażliwość układu dopaminowego u zwierząt badanych w różnych modelach ELS.

Wykazano między innymi, że zarówno stres prenatalny, jak i MS nasila działanie substancji psychostymulujących i zwiększa tendencję do „uzależniania się” u zwierząt dorosłych. Stwierdzono to w licznych testach modelujących procesy uzależnienia u zwierząt, a mianowicie badając: (a) ruchliwość indukowaną podaniami kokainy, (b) sensytyzację psychoruchową wywołaną kokainą, amfetaminą i morfiną, (c) samopodawanie psychostymulantów (Brake et al., 2004; Chocyk et al., 2011b; Henry et al., 1995; Kikusui et al., 2005; Kippin et al., 2008; Kosten et al., 2005; Matthews et al., 1999; Moffett et al., 2006; Moffett et al., 2007; Ploj et al., 2003). Potwierdzają to również liczne badania biochemiczne na poziomie prążkowiec i jądra półleżącego przegrody, które wykazały np., że MS nasila bazalne, jak również stymulowane podaniami kokainy i amfetaminy uwalnianie dopaminy (Hall et al., 1999; Kosten et al., 2005), a także obniża ekspresję transportera dopaminowego i zwiększa ilość receptorów dopaminowych D1 u osobników dorosłych (Brake et al., 2004; Moffett et al., 2006). W korze przedczołowej zwierząt podlegających MS zaobserwowano natomiast zmniejszenie ilości zakończeń dopaminowych (Braun et al., 2000). Powyższe rezultaty badań w modelach zwierzęcych dobrze korelują z danymi klinicznymi i epidemiologicznymi wskazującymi, że ELS zwiększa ryzyko nadużywania substancji psychoaktywnych i powstania uzależnień u ludzi (Andersen & Teicher, 2009; Green et al., 2010). Reasumując, zgromadzone dane pośrednio wskazują, iż ELS interferuje z rozwojem i dojrzewaniem układu dopaminowego (Rodrigues et al., 2011). Niestety, mechanizmy tej interferencji pozostają słabo poznane.

W rozwoju układu dopaminowego można wyróżnić dwa etapy: prenatalny i postnatalny. W okresie prenatalnym dochodzi do powstania wszystkich komórek dopaminowych (u gryzoni pomiędzy 11 a 15 dniem, a u ludzi między 6 a 8 tygodniem życia embrionalnego) i ich migracji do miejsc ostatecznego występowania (zakończonych tuż przed urodzeniem) (Johnson, 2003; Orme et al., 2009; Zecevic and Verney, 1995). Po urodzeniu rozpoczyna się okres dojrzewania układu dopaminowego. Został on stosunkowo dobrze poznany u gryzoni i składa się na niego: (a) apoptoza (programowana śmierć) niepotrzebnych komórek dopaminowych w SN i VTA (PND 0 – PND 14), (b) wydłużanie aksonów i różnicowanie zakończeń nerwowych (PND 0 – PND 30), (c) tworzenie synaps (PND 13 – PND 30) oraz (d) proces intensywnej gliogenezy (PND 7 – PND 21) (Bandeira et al., 2009; Burke, 2003). Zatem można uznać, że u gryzoni zarówno dwa ostatnie tygodnie życia embrionalnego jak i pierwsze cztery tygodnie życia postnatalnego stanowią okres szczególnej wrażliwości układu

dopaminowego na różne czynniki (w tym na stres), a interwencje eksperymentalne podejmowane w tym okresie czasu (np., MS w PND 1-14) mogą potencjalnie interferować z jego rozwojem i dojrzewaniem. Ponadto, u gryzoni pomiędzy PND 1 a PND 14 występuje zwykle okres obniżonej odpowiedzi na stres, z ang. *stress hyporesponsive period* (SHRP). Okres ten, w warunkach podstawowych, ma zabezpieczać dojrzewający organizm (w tym mózg) przed szkodliwymi wahaniami w poziomie glikokortykosteroidów (de Kloet et al., 2005; Levine, 2001). Liczne badania wskazują, że to zespół ściśle określonych zachowań matki w stosunku do potomstwa podtrzymuje i reguluje istnienie SHRP u gryzoni. Do zachowań tych zalicza się lizanie, czyszczenie, grupowanie młodych i karmienie ich w aktywnej postawie, z charakterystycznie wygiętym grzbietem (z ang. *arched-back nursing*), która umożliwia licznemu zwykle potomstwu swobodny dostęp do pożywienia (Levine, 2001; van Oers et al., 1998). Uważa się, iż zaburzenie interakcji matka-potomstwo, np., poprzez stosowanie procedury MS, prowadzić może do nieprawidłowej regulacji procesów odpowiedzialnych za przebieg SHRP i do jego zniesienia. W konsekwencji, zachwianiu ulega równowaga w stężeniu hormonów glikokortykosteroidowych, co może bezpośrednio zagrozić rozwijającemu się mózgowi (de Kloet et al., 2005; Levine, 2001; van Oers et al., 1998). Hormony te odgrywają bowiem ogromną rolę w rozwoju mózgu. Biorą udział w regulacji zarówno procesów proliferacji jak i apoptozy komórek nerwowych i glejowych oraz w ich różnicowaniu, a także w procesach wydłużania zakończeń nerwowych i ich mielinizacji (Matthews, 2001). Istnieją opinie naukowe wskazujące, iż analogiczny okres obniżonej odpowiedzi na stres, SHRP, można wyróżnić również w rozwoju człowieka i że przypada on na pierwszy rok życia. Podobnie jak u gryzoni jego przebieg regulowany jest przez interakcje socjalne z opiekunami (Gunnar & Donzella, 2002).

Powyższe fakty, jak również brak szeroko zakrojonych badań nad wczesnymi efektami ELS (u młodych zwierząt), umożliwiającymi uchwycenie podłoża zaburzeń układu dopaminowego, skłoniły mnie do podjęcia badań nad wpływem MS na procesy dojrzewania układu dopaminowego w SN i VTA szczurów. W szczególności zajęłam się zbadaniem efektów stresu występujących 24 godziny po zakończeniu procedury MS. W tym celu analizowany był wpływ MS na: (a) liczbę neuronów i komórek glejowych, (b) liczbę komórek wykazujących ekspresję hydroksylazy tyrozynowej (TH), enzymu limitującego syntezę dopaminy i będącego markerem komórek dopaminowych w śródmózgowiu, (c) na procesy neurorozwojowej apoptozy i (d) ekspresję białek adhezji

komórkowej NCAM (z ang. *neural cell adhesion molecules*) w SN i VTA osesków szczurzych (PND 15) obu płci. Niektóre parametry, takie jak liczba komórek TH-immunoreaktywnych (TH-IR) czy ekspresja NCAM, badane były również w okresie adolescencji i dorosłości zwierząt.

IIB. Wpływ MS na dojrzewanie układu dopaminowego – opis wyników

Należy podkreślić na wstępie, że zastosowana do modelowania ELS procedura MS wywoływała u zwierząt dorosłych typowe efekty behawioralne, opisywane także przez innych badaczy, a mianowicie zwiększenie wrażliwości na podania kokainy mierzone w teście aktywności lokomotorycznej ^{*}(Chocyk et al., 2011b). Zasadnym zatem wydawało się poszukiwanie podłoża obserwowanych zmian behawioralnych na etapie wczesnego rozwoju i dojrzewania układu dopaminowego.

Badania prowadzono głównie przy pomocy technik histologicznych i immunohistochemicznych oraz analizy stereologicznej. Wykazano w nich po pierwsze, że choć MS nie wpływa na całkowitą liczbę neuronów w SN i VTA w PND 15, to zaburza jednak liczebność jednej z populacji komórek obecnych w tych strukturach, a mianowicie populacji neuronów TH-IR (potencjalnie dopaminowych) (Chocyk et al., 2011b). Obserwowano zmniejszenie liczby neuronów TH-IR w części siatkowatej SN (SN *pars reticulata*: SNr) i w VTA, zarówno u stresowanych samic jak i samców. Zmiany te okazały się charakterystyczne tylko dla zwierząt w PND 15; dalsze badania w okresie adolescencji i dorosłości nie wykazały podobnej tendencji (Chocyk et al., 2011b). W przypadku samców, na dalszych etapach życia, w ogóle nie obserwowano wpływu MS na liczbę komórek TH-IR w SN i VTA. U samic MS, wykazano natomiast wzrost liczby neuronów TH-IR w SNr w okresie adolescencji (przejściowy) i w VTA u zwierząt dorosłych. Obserwowane w trakcie ontogenezy fluktuacje w ilości komórek TH-IR, występujące pod wpływem stresu, ale też u zwierząt kontrolnych (szczególnie ontogenetyczny wzrost liczby neuronów TH-IR u samców w SNc i VTA), nie świadczą raczej o zmianie liczby komórek dopaminowych (Chocyk et al., 2011b). Istnienie procesów postnatalnej neurogenezy w SN jest wciąż bowiem pod wielkim znakiem zapytania, ale raczej kwestionowane (Frielingsdorf et al., 2004; Shan et al., 2006; Zhao and Janson Lang, 2009). W przypadku wyników pokazujących przejściowy spadek

^{*} Wszystkie zacytowane w części 4c Autoreferatu prace autorstwa Chocyk et al. wchodzą w skład osiągnięcia naukowego

liczby komórek TH-IR w SN i VTA w PND 15, wywołany przez MS, wykluczyć raczej możemy również zmianę liczby komórek dopaminowych jako konsekwencję indukcji procesów wiodących do ich śmierci na drodze apoptozy. Tym bardziej, że dalsze badania nie wykazały wpływu MS na apoptozę neuronów SN i VTA, w tym neuronów TH-IR (**Chocyk et al., 2011a**). Uzyskane rezultaty oraz dostępne dane literaturowe wskazują raczej, że poziom ekspresji TH w poszczególnych komórkach może zmieniać się w ciągu życia i/lub w wyniku stresu (Bjorklund & Dunnett, 2007; Katunar et al., 2009; Katunar et al., 2010), wpływając na stopień detekcji komórek TH-IR w metodzie immunohistochemicznej i tym samym na oszacowanie liczebności populacji tych komórek (**Chocyk et al., 2011b**).

W następnym etapie badań skoncentrowano się na określeniu wpływu MS na funkcjonowanie komórek glejowych w SN i VTA, pełnią one bowiem istotną rolę w prawidłowym przebiegu neurorozwoju (Seth & Koul, 2008). Otóż, badania wykazały, że komórki te są szczególnie wrażliwe na działanie ELS. MS powodowała zmniejszenie liczby komórek nieneuronalnych w części zbitej SN (*pars compacta*: SNc) i w VTA u samców (w barwieniu Nissla) (**Chocyk et al., 2011a**). Następnie, badania przy użyciu przeciwciał rozpoznających specyficzny marker astrogleju, białko S-100 β , pokazały, że MS wywołuje zmniejszenie liczby komórek astrocytarnych w SN samic i VTA samców (**Chocyk et al., 2011a**). Liczba komórek jest wypadkową przebiegu dwóch procesów: proliferacji i apoptozy, zatem w dalszej kolejności zajęliśmy się wpływem MS na te właśnie procesy. Stwierdzono, że MS hamują proliferację komórek glejowych w SN i VTA, przejawiało się to w zmniejszeniu ilości komórek wykazujących ekspresję antygenu Ki-67 (markera komórkowej proliferacji). Zatem można wnioskować, że spadek liczby komórek glejowych obserwowany u zwierząt stresowanych (szczególnie w VTA samców) wynika z osłabienia procesów proliferacyjnych (**Chocyk et al., 2011a**). Wpływ MS na procesy neurorozwojowej apoptozy komórek glejowych w SN i VTA okazał się być bardzo złożonym. Przy użyciu techniki TUNEL, badającej fragmentację DNA, a zatem końcową fazę procesu apoptozy, zaobserwowano zmniejszenie ilości komórek TUNEL+ o morfologii apoptotycznej, głównie u samców podlegających MS. Towarzyszyło mu (wyłącznie u samców) zmniejszenie ilości komórek apoptotycznych wykazujących ekspresję aktywnej kaspazy-9 (głównego enzymu proteolitycznego inicjującego ścieżkę mitochondrialną apoptozy) oraz osłabienie aktywności enzymatycznej kaspazy-3 w SN, będącej główną kaspazą efektorową apoptozy (**Chocyk et al., 2011a**). Powyższe dane wskazują na

zahamowanie procesów apoptotycznych u zwierząt stresowanych i mogą sugerować włączenie specyficznych procesów kompensacyjnych w obliczu osłabionej przez MS proliferacji i zmniejszonej liczebności komórek glejowych. Zaznaczyć również należy, iż badania nad fenotypowaniem komórek o morfologii apoptotycznej wykazujących obecność aktywnej kaspazy-9 pokazały, że komórki te należą do populacji komórek mikroglejowych, a nie astrocytarnych czy oligodendrocytarnych (**Chocyk et al., 2011a**), zatem nie można wykluczyć, że zahamowanie apoptozy może dotyczyć tej konkretnej populacji komórek glejowych. Innym obserwowanym efektem MS było zwiększenie liczby komórek wykazujących ekspresję białka aktywnej formy kaspazy-3 w SN i VTA u samic i samców. Co ciekawe, pomimo tego, że obecność aktywnej formy kaspazy-3 wskazywać może na aktywację procesów apoptotycznych, komórki te nie miały morfologii komórek umierających i ujawniały fenotyp astrogleju (S-100 β -IR) (**Chocyk et al., 2011a**). Biorąc pod uwagę, iż MS obniżała bądź pozostawała bez wpływu na aktywność enzymatyczną kaspazy-3 (określaną na podstawie stopnia proteolizy substratu specyficznego dla tej kaspazy), uzyskane wyniki mogą sugerować, że obecna w astrocytach aktywna forma kaspazy-3 nie jest związana z typowymi dla apoptozy funkcjami. Ostatnimi czasy rośnie liczba doniesień literaturowych pokazujących konstytutywną bądź indukowaną obecność aktywnej kaspazy-3 o nieapoptotycznych funkcjach właśnie w komórkach astrogleju rozwijającego się mózgu (Acarin et al., 2007; Mooney and Miller, 2000; Noyan-Ashraf et al., 2005; Oomman et al., 2004). Coraz częściej mówi się także o zaangażowaniu kaspaz, dawniej kojarzonych głównie z procesami apoptotycznymi, w różne ważne procesy, od regulacji proliferacji i różnicowania, po neuroprotekcję i procesy plastyczności synaptycznej (Dash et al., 2000; Gulyaeva et al., 2003; Lamkanfi et al., 2007; McLaughlin et al., 2003; Seth and Koul, 2008). Zatem, obserwowany u zwierząt stresowanych obu płci, wzrost liczby komórek astrocytarnych wykazujących ekspresję aktywnej formy kaspazy-3 może znowu świadczyć o włączeniu procesów kompensacyjnych, których końcowym efektem może być, np. stymulacja proliferacji i różnicowania astrocytów.

Kolejnym aspektem badań nad interferencją ELS w procesy dojrzewania układu dopaminowego było określenie czy MS wpływa na ekspresję neuronalnych białek adhezji komórkowej NCAM. Białka te odgrywają kluczową rolę w procesach neurorozwojowych, gdyż, mediując procesy adhezji typu komórka-komórka lub komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, uczestniczą we wzroście i naprowadzaniu dendrytów i aksonów oraz w tworzeniu i stabilizacji synaps (Ditlevsen et al., 2008;

Togashi et al., 2009). Przez całe życie białka NCAM biorą zaś udział w procesach plastyczności synaptycznej (w tworzeniu nowych i likwidacji niepotrzebnych synaps), a co za tym idzie w procesach uczenia się i pamięci (Mackowiak et al., 2009; Togashi et al., 2009). W ostatnich latach poznano także nowe funkcje białek NCAM, niezwiązane z adhezją. Otóż odkryto ich specjalną rolę w regulacji funkcji układu dopaminowego. Jak się bowiem okazało, białka NCAM wchodzą w skład kompleksu receptora dla GDNF (czynnika troficznego pochodzenia glejowego, z ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*), który to czynnik wykazuje specyficzne działanie na komórki dopaminowe (Cao et al., 2008; Chao et al., 2003). Wykazano, że białka NCAM pośrednicząc w działaniu GDNF regulują: (a) wzrost i przeżywalność neuronów dopaminowych, (b) tempo obrotu dopaminy, (c) aktywność lokomotoryczną (Cao et al., 2008; Chao et al., 2003). Wykazano, również, że białka NCAM uczestniczą bezpośrednio w internalizacji receptorów dopaminowych D2 oraz w regulacji szlaków transdukcji sygnału receptorów dopaminowych (Xiao et al., 2009). Co ciekawe, myszy transgeniczne pozbawione genu NCAM wykazują zmniejszoną liczbę komórek TH-IR w SN i zwiększoną aktywność lokomotoryczną po podaniach agonistów receptorów dopaminowych, w stosunku do zwierząt dzikich (Xiao et al., 2009). W świetle powyższych doniesień literaturowych, bardzo interesujące wydają się rezultaty badań własnych pokazujące, że w PND 15 MS obniża ekspresję białek NCAM w SN samic i VTA samców (Chocyk et al., 2010). Efekt ten, w przypadku samic, utrzymuje się nawet do okresu adolescencji (PND 35) (Chocyk et al., 2010). Co więcej, analiza ekspresji białek NCAM w innych strukturach związanych z układem dopaminowym, takich jak prążkowie i kora przedczołowa (mPFC), wykazała zmniejszenie poziomu badanych białek w mPFC w okresie adolescencji (u samic) i dorosłości (u samców), nie zaś w okresie wczesnorozwojowym (Chocyk et al., 2010).

IIc. Wpływ MS na procesy dojrzewania układu dopaminowego – implikacje funkcjonalne

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż procedura MS, zastosowana w pierwszych dwóch tygodniach życia szczura znacząco wpływa na procesy związane z dojrzewaniem SN i VTA, zatem powyższy okres czasu można uznać za okno wrażliwości układu dopaminowego na działanie stresu (z ang. *window of susceptibility*).

Zmniejszenie liczby komórek wykazujących ekspresję TH w SNr i VTA, występujące u młodych zwierząt podlegających MS, może implikować powstanie zaburzeń w prawidłowym rozwoju i/lub funkcjonowaniu zakończeń dopaminergicznych w systemach nigrostriatalnym i mezokortykolimbicznym.

Nieprawidłowości w unerwieniu szlaku nigrostriatalnego mogą wpływać na funkcjonowanie jąder podstawy. Jądra te, oprócz programowania funkcji motorycznych, regulują wiele innych zachowań, takich jak: (a) zachowania eksploracyjne, (b) zachowania zorientowane na cel, (c) podejmowanie i wybór działań, (d) tworzenie nawyków (Chakravarthy et al., 2010). Najświeższe dane wskazują też, że upośledzenie funkcji jąder podstawy może wiązać się z patomechanizmami schizofrenii, depresji i zaburzeń obsesyjno-kompulsywnych (Chakravarthy et al., 2010; Haynes and Mallet, 2010; Perez-Costas et al., 2010). Z drugiej zaś strony, zaburzenia w rozwoju unerwienia szlaku mezokortykolimbicznego mogą odpowiadać za opisywane w literaturze nasilenie działania substancji psychostymulujących i większą skłonność do „uzależniania się” obserwowane u zwierząt dorosłych, które przeszły procedurę MS (Brake et al., 2004; **Chocyk et al., 2011b**; Henry et al., 1995; Kikusui et al., 2005; Kippin et al., 2008; Kosten et al., 2005; Matthews et al., 1999; Moffett et al., 2006; Moffett et al., 2007; Ploj et al., 2003)

Ważne implikacje funkcjonalne mogą być również związane z wpływem MS na liczbę komórek glejowych oraz na procesy ich proliferacji i apoptozy w SN i VTA młodych zwierząt. Tu należy wspomnieć o tradycyjnych i tych mniej znanych funkcjach komórek glejowych. Tradycyjnie, komórki glejowe uważane są za fizyczną podporę neuronów oraz źródło substancji odżywczych, neurotrofin i antyoksydantów niezbędnych dla prawidłowego przebiegu neurorozwoju (Seth & Koul, 2008). Dane literaturowe pokazują obecność GDNF i BDNF (z ang. *brain-derived neurotrophic factor*) w astrocytach SN (Knott et al., 2002; Hung et al., 2008; Wu et al., 2008). Oba czynniki troficzne są kluczowe dla przeżycia, dojrzewania i prawidłowego funkcjonowania komórek dopaminowych (Cao et al., 2008; Chao et al., 2003; Hung et al., 2008; Oo et al., 2009). Szczególną zaś funkcją komórek mikrogleju, obok regulacji homeostazy i fagocytozy uszkodzonych, martwych komórek, jest udział w odpowiedzi immunologicznej (Liu et al., 2011). Uważa się, iż astrocyty i komórki mikrogleju modułują wrażliwość neuronów dopaminowych na czynniki neurotoksyczne (Teismann & Schulz, 2004; Smeyne et al., 2005; Anastasia et al., 2009; Liu et al., 2011). Liczba i rodzaj komórek glejowych w SN może być ważnym czynnikiem determinującym

przeżywalność komórek dopaminowych (Smeyne et al., 2005). Wykazano bowiem, iż szczepy myszy opornych na neurotoksynę MPTP (1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-czterohydro pirydynę) mają większą liczbę astrocytów, a mniejszą komórek mikroglejowych w SNc w porównaniu do zwierząt wrażliwych na MPTP (Smeyne et al., 2005). Zatem MS, interferując z procesami apoptozy i proliferacji komórek glejowych i co za tym idzie wpływając na liczebność konkretnych ich populacji, może pośrednio wpływać na dobrostan komórek dopaminowych w SN i VTA i przez to na funkcjonowanie dopaminowego systemu neurotransmisyjnego.

Wiele doniesień literaturowych ostatniej dekady wskazuje, że wachlarz poznanych funkcji komórek glejowych wciąż ulega rozszerzeniu (Seth & Koul, 2008; Pfrieder, 2010). Ostatnimi czasy zgromadzono liczne dowody na rolę komórek glejowych w tworzeniu i stabilizacji synaps, zatem na ich udział w procesach plastyczności synaptycznej (Seth & Koul, 2008; Pfrieder, 2010). W tym świetle, dane pokazujące wpływ MS na liczbę komórek glejowych w SN i VTA nabierają jeszcze innego znaczenia, mogąc sugerować interferencję ELS w procesy plastyczności synaptycznej. Powyższa hipoteza może być wzmocniona wynikami pokazującymi hamujący wpływ MS na ekspresję białek NCAM, których kluczową rolą jest udział właśnie w procesach plastyczności synaptycznej (Togashi et al., 2009). Z drugiej strony, obniżenie poziomu białek NCAM, potencjalnie wchodzących w skład receptorów dla GDNF w SN i VTA, może bezpośrednio wpływać na rozwój i dojrzewanie neuronów dopaminowych i w konsekwencji prowadzić do zaburzeń ich funkcjonowania na dalszych etapach ontogenezy. Może to stanowić podłoże wielu schorzeń psychicznych, których ryzyko powstania wiąże się z doświadczeniem ELS (Andersen & Teicher, 2009; Green et al., 2010; Kessler et al., 2010).

III. Wpływ MS na procesy strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w przyśrodkowej części kory przedczołowej (mPFC)

IIIa. Rola mPFC w patofizjologii zaburzeń nastroju i lękowych – znaczenie ELS w etiologii

mPFC jest strukturą przodomózgowia zaangażowaną w regulację szeregu procesów kognitywnych i emocjonalnych. W szczególności brzuszna część mPFC

(*ventral*, vmPFC) odpowiedzialna jest za kontrolę takich procesów jak: (a) strach i lęk, (b) podejmowanie decyzji i ryzyka, (c) procesy uwagi (Heidbreder & Groenewegen, 2003). Na podstawie badań klinicznych z zastosowaniem neuroobrazowania, jak również badań *post mortem*, stwierdzono, iż mPFC jest jedną z głównych struktur mózgowych (obok hipokampa i jąder migdałowatych) dotkniętą dysfunkcją u osób cierpiących na zaburzenia nastroju i lęk (Drevets et al., 2008; Myers-Schulz & Koenigs, 2012). Wykazano, że u pacjentów z rozpoznaniem zaburzeń lękowych i nastroju występują liczne nieprawidłowości morfologiczne i czynnościowe na poziomie mPFC, np., (a) redukcja objętości istoty szarej, (b) zmniejszenie ilości synaps i białek synaptycznych, (c) eliminacja komórek glejowych, (d) zmiany w aktywności neuronalnej i metabolicznej (Drevets et al., 2008; Hayes et al., 2012; Myers-Schulz & Koenigs, 2012).

mPFC wykazuje wydłużoną trajektorię rozwojową. Ten obszar mózgu należy do najpóźniej dojrzewających w rozwoju (Brenhouse & Andersen, 2011). Nie dziwi zatem fakt, że mPFC jest szczególnie wrażliwa na działanie niekorzystnych czynników we wczesnym okresie życia, takich jak np. ELS. Dzięki technikom neuroobrazowania mózgu stwierdzono obecność dysfunkcji kory przedczołowej u dzieci, adolescentów i dorosłych z doświadczeniem ELS (van Harmelen et al., 2010; Hanson et al., 2012; Wang et al., 2013; Rinne-Albers et al., 2013). W szczególności obserwowano redukcję objętości mPFC (van Harmelen et al., 2010; Hanson et al., 2012; Rinne-Albers et al., 2013) oraz zaburzenie aktywności mPFC w odpowiedzi na stres (osłabienie zdolności do adaptacji) (Wang et al., 2013). W trakcie rozwoju pourodzeniowego okres adolescencji jawi się jako czas szczególnych przemian morfologicznych i funkcjonalnych w obrębie mPFC (Brenhouse & Andersen, 2011). W tym okresie dochodzi do: (a) redukcji objętości istoty szarej mPFC, (b) eliminacji zbędnych synaps, (c) intensywnej mielinizacji, (d) dynamicznych zmian receptorowych (np., w obrębie receptorów dopaminowych) (Brenhouse & Andersen, 2011; Brenhouse, 2013). Ponadto, w okresie adolescencji podkorowe struktury limbiczne wyprzedzają w rozwoju obszar mPFC (Brenhouse & Andersen, 2011). Nieprawidłowości w dojrzewaniu mPFC zaistniałe w okresie adolescencji mogą tłumaczyć pojawianie się pierwszych symptomów wielu chorób psychicznych (takich jak schizofrenia, zaburzenia nastroju, zaburzenia lękowe, nadużywanie substancji) właśnie w tym okresie ontogenezy. Poza tym, sam przebieg procesu dojrzewania może wyzwolić ujawnienie się wcześniej powstałych zaburzeń, np., wywołanych ELS. Dane epidemiologiczne wskazują, że ELS

przyspiesza pojawienie się pierwszych epizodów psychopatologii do okresu dzieciństwa i adolescencji (Kessler et al., 2010). Do niedawna niewiele badań eksperymentalnych (w modelach zwierzęcych) prowadzonych było z udziałem osobników młodocianych. Stan wiedzy dotyczący funkcji mPFC w okresie adolescencji i jej modyfikacji pod wpływem wcześniejszych doświadczeń jest wciąż ograniczony. Powyższe przesłanki skłoniły mnie do podjęcia kolejnych badań w modelu MS i poszukiwania odpowiedzi na pytanie, czy ELS interferuje z procesami plastyczności synaptycznej w obrębie mPFC u zwierząt w okresie adolescencji i czy wywołuje fenotyp behawioralny świadczący o dysfunkcji mPFC.

IIIb. Wpływ MS na procesy strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w mPFC – opis wyników

Procesy plastyczności synaptycznej leżą u podstaw zdolności mózgu do nieustannej adaptacji w obliczu nowych doświadczeń i zmieniającego się środowiska. Plastyczność synaptyczna realizuje się na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym (Lisman et al., 2002). Pojęcie plastyczność strukturalnej dotyczy zmian morfologicznych w obrębie drzewa dendrytycznego w tym tworzenia bądź eliminacji synaps. Wpływ MS na plastyczność strukturalną mPFC badano za pomocą techniki impregnacji Golgi-Cox i analizy morfometrycznej długości dendrytów apikalnych i bazalnych komórek piramidowych warstwy II/III mPFC (w regionie kory prelimbiczej, z ang. *prelimbic cortex*, PLC) oraz gęstości kolców dendrytycznych na dendrytach bazalnych i apikalnych tychże komórek (Chocyk et al., 2013a). Badania wykazały, że u zwierząt w okresie adolescencji MS powodowała atrofię bazalnego drzewka dendrytycznego oraz zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych zarówno na dendrytach bazalnych jak i apikalnych (Chocyk et al., 2013a).

Następnie, za pomocą technik elektrofizjologicznych badano wpływ MS na funkcjonalny aspekt plastyczności synaptycznej czyli na zdolność do indukcji i utrzymania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (z ang. *long-term potentiation*, LTP) w PLC adolescentów. Proces prowadzący do powstania LTP zostaje zainicjowany przez gwałtowną stymulację presynaptyczną o wysokiej częstotliwości, prowadzącą do uwolnienia glutaminianu, który to z kolei aktywuje postsynaptyczne receptory AMPA i NMDA. Otwarcie kanałów receptorów NMDA prowadzi następnie do napływu jonów

wapnia do komórki postsynaptycznej, co uruchamia kaskadę biochemiczną prowadzącą do wzmocnienia siły synaptycznej. W szczególności, napływające jony wapnia aktywują kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny II, z ang. $\alpha\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin-dependent protein kinase II}$, αCaMKII (autofosforylacja), która to ulega translokacji do synaps gdzie wbudowuje się w gęstość postsynaptyczną (PSD) i uczestniczy w procesie translokacji receptorów AMPA do synaps i ich fosforylacji (aktywacji). Wszystko to prowadzi do potencjalizacji zależnych od receptorów AMPA postsynaptycznych prądów pobudzających (Lisman et al., 2002).

Badania wykazały, że procedura MS nie zmieniała podstawowej odpowiedzi elektrofizjologicznej w PLC ani nie wpływała na komponenty potencjału polowego zależne od receptorów AMPA czy NMDA. MS nie hamowała również indukcji LTP, natomiast znamienne osłabiała ten proces w trakcie całości jego przebiegu (**Chocyk et al., 2013a**). Poszukując mechanizmów uzyskanego efektu MS wykonano następnie analizę ekspresji kluczowych białek zaangażowanych w procesy LTP w mPFC (Western blot): (a) receptorów AMPA, NMDA, GABA_A ($\alpha 1$, $\alpha 4$), (b) białek PSD-95, (c) αCaMKII oraz fosforyzowanych form αCaMKII (Thr305 i Thr286) (Lisman et al., 2002). W przypadku pomiaru ekspresji białek receptorowych badano równocześnie wpływ MS na ich rozmieszczenie we frakcji membranowej (potencjalnie synaptycznej) oraz wewnątrzkomórkowej mPFC, za pomocą techniki tzw. cross-linkowania białek powierzchniowych z BS3 (suberynianem disulfosukcynimidylowym). Wykazano, że MS powoduje nasilenie ekspresji całkowitej puli (błonowej + wewnątrzkomórkowej) podjednostek receptorów AMPA (GluR1 i GluR2). Ponadto, zwierzęta MS wykazywały zwiększony poziom PSD-95, αCaMKII oraz $\alpha\text{CaMKII-P(Th305)}$. MS nie wpływała natomiast na ekspresję receptorów NMDA i GABA_A czy $\alpha\text{CaMKII-P(Th286)}$ (**Chocyk et al., 2013a**). Uzyskane wyniki biochemiczne sugerują, że MS, poprzez zwiększenie ekspresji szeregu białek zaangażowanych w procesy wzmocnienia siły synaptycznej, może prowadzić do saturacji bądź okluzji LTP wzbudzonego elektrycznie.

IIIc. Wpływ MS na procesy plastyczności synaptycznej w mPFC – implikacje funkcjonalne

Uzyskane wyniki wskazują, że ELS interferuje z procesami plastyczności synaptycznej w mPFC w okresie adolescencji. Co więcej ELS sam z siebie może być

uznany za rodzaj doświadczenia wyzwalającego plastyczność mPFC. Zatem, jedno doświadczenie życiowe (z ang. *priming, preconditioning*), np., ELS, wpływa na efekty drugiego doświadczenia indukując „plastyczność plastyczności synaptycznej” określaną jako metaplastyczność (Abraham & Bear, 1996). Pojęcie metaplastyczności oryginalnie odnosiło się do modyfikacji procesów LTP i LTD jednak w ostatnim czasie wykorzystuje się je w szerszym rozumieniu do opisu zmian plastycznych mózgu indukowanych stresem (Abraham & Bear, 1996; Schmidt et al., 2013).

Zmiany w procesach plastyczności synaptycznej mPFC wywołane przez ELS mogą stanowić patomechanizm wielu psychopatologii. Proces LTP jest uważany za główny mechanizm komórkowy leżący u podstaw procesów uczenia się i pamięci (Lisman et al., 2002). Osłabienie LTP w mPFC wywołane przez ELS może tłumaczyć deficyty kognitywne często obserwowane w zwierzęcych modelach ELS (Wang et al., 2011; Mehta & Schmauss, 2011). Ponadto, procesy plastyczności synaptycznej mPFC odgrywają ważną rolę w regulacji zachowań lękowych bezwarunkowych (z ang. *innate fear*) oraz w tworzeniu pamięci lękowej (z ang. *fear memory*) (Lisboa et al., 2010; Miller et al., 2012). Wiele danych literaturowych wskazuje, że ELS zaburza zachowania lękowe u zwierząt dorosłych (Uchida et al., 2010; Wang et al., 2011). Niewielka ilość opublikowanych badań behawioralnych z okresu adolescencji skłoniła mnie do sprawdzenia czy zaburzeniom na poziomie plastyczności synaptycznej obserwowanym u zwierząt MS towarzyszy fenotyp behawioralny świadczący o dysfunkcji mPFC. W szczególności zbadano lękliwość zwierząt w teście eksploracji light/dark box (reakcja lękowa bezwarunkowa) oraz warunkowany lęk (z ang. *conditioned fear*).

IV. Wpływ MS na zachowania lękowe

mPFC i jej precyzyjnie regulowane obustronne połączenia z jądrami migdałowatymi i hipokampem stanowią kluczowy element obwodu neuronalnego regulującego procesy lęku i strachu (Likhtik et al., 2013; Sotres-Bayon et al., 2012). Dowiedziono, że mPFC, w szczególności obszar PLC odpowiedzialny jest za ekspresję zachowań lękowych (zarówno tych bezwarunkowych jak i warunkowanych) oraz za konsolidację pamięci lękowej (Marek et al., 2013; Sierra-Mercado et al., 2011).

Do oceny zachowań lękowych bezwarunkowych w okresie adolescencji wybrano test eksploracji light/dark box, w którym to zwierzę umieszczone zostaje w

nowym dla niego środowisku i ma wybór pomiędzy przebywaniem w jasnym i ciemnym kompartmentie klatki pomiarowej. W sposób naturalny szczury preferują ciemny (nieoświetlony) kompartment pudełka, przejawia się to w zwiększonym czasie przebywania w nim i w zwiększonej eksploracji tego obszaru w porównaniu do części jasnej (silnie oświetlonej) pudełka. Liczba przejść pomiędzy ciemną i jasną częścią, jak również czas spędzony w jasnym kompartmentie oraz jego eksploracja niesie informację o stopniu lęku/ciekawości szczura w zetknięciu z mniej komfortowym środowiskiem. Badania wykazały, że zwierzęta MS (samce) zachowywały się bardziej lęklivo w trakcie testu niż zwierzęta kontrolne (AFR). Przejawiało się to: (a) mniejszą liczbą przejść między jasną i ciemną częścią pudełka, (b) krótszym czasem przebywania w części jasnej, (c) krótszym dystansem przebytym w części jasnej (mniejszą aktywnością lokomotoryczną), (d) mniejszą liczbą wspięć (z ang. *rearings*) (**Chocyk et al., 2013a**).

Wpływ MS na procesy warunkowania lęku (*fear conditioning*) czyli procesy pamięci o zdarzeniach awersyjnych (*fear memory*) badano wykorzystując procedurę warunkowania klasycznego (pawłowskiego) (Pavlov, 1927). Pamięć lękowa (warunkowanie) zostaje wytworzona poprzez kojarzenie tonu dźwiękowego i konkretnego środowiska/kontekstu (bodźce warunkowe) z awersyjnym szokiem elektrycznym (bodziec bezwarunkowy). 24 godziny po treningu badana jest ekspresja warunkowania, poprzez ekspozycję zwierząt na środowisko warunkujące (kontekst A), a dwie godziny później analizuje się odpowiedź szczura na sam ton (w innym środowisku niż warunkujące – w kontekście B) (Pavlov, 1927). Siła warunkowania zostaje wyrażona jako poziom lęku mierzony znieruchomieniem zwierząt (z ang. *freezing*). Dodatkowo, w badaniach zastosowano procedurę wygaszania warunkowanego lęku (ekstynkcji, z ang. *extinction*), polegającą na wielokrotnej ekspozycji zwierząt na ton (45 powtórzeń) w kontekście B (24 h po warunkowaniu) (Quirk et al., 2010).

Badania wykazały, że u zwierząt w okresie adolescencji, MS osłabia ekspresję warunkowanego lęku zarówno w odpowiedzi na kontekst warunkujący A (*contextual fear conditioning*) jak i na ton (*auditory fear conditioning*) w kontekście B (u zwierząt obu płci). Nie obserwowano wyraźnego efektu MS na ekstynkcję lęku, gdyż zwierzęta MS poddane ekstynkcji i te nie poddane charakteryzowały się równie niskim poziomem lęku (**Chocyk et al., 2014**). Co więcej, w dorosłości, zwierzęta MS uwarunkowane w okresie adolescencji dalej wykazywały obniżony lęk w odpowiedzi na kontekst A

(zwierzęta obu płci) i na ton w kontekście B (tylko samce). Ponowne warunkowanie tych zwierząt w okresie dorosłości (*retraining*) skutkowało osłabieniem nabywania warunkowania i utrzymującym się obniżonym poziomem lęku w odpowiedzi na kontekst A (*contextual fear conditioning*) (Chocyk et al., 2014).

Obserwowany wpływ MS na ekspresję bezwarunkowego i warunkowanego lęku przy braku wpływu na proces nabywanie pamięci lękowej u adolescentów silnie przemawia za dysfunkcją mPFC, szczególnie obszaru PLC i koreluje z wcześniej opisanymi danymi dotyczącymi zaburzeń procesów plastyczności synaptycznej w PLC zwierząt MS (Chocyk et al., 2013a). Co ciekawe, w okresie adolescencji zwierzęta MS wykazują dwa przeciwstawne fenotypy lękowe w zależności od użytej procedury badającej procesy lękowe, a mianowicie nasilenie lęku bezwarunkowego (Chocyk et al., 2013a) i osłabienie lęku warunkowanego (Chocyk et al., 2014). Uzyskane efekty behawioralne jeszcze mocniej wskazują na istnienie specyficznego zaburzenia funkcji mPFC u zwierząt MS, gdyż jak wykazali inni badacze, lezje mPFC oraz chemiczne zahamowanie transmisji synaptycznej w mPFC wywołują podobny fenotyp behawioralny do tego uzyskanego w naszych badaniach, czyli większą lękliwość (*innate fear*) i osłabienie pamięci lękowej (*conditioned fear*) (Lacroix et al., 2000; Lisboa et al., 2010). Powstaje pytanie, czy obserwowany u zwierząt MS charakterystyczny fenotyp lękowy ma aspekt pozytywny czy negatywny dla funkcjonowania osobnika w zmiennym środowisku i czy zawsze wiąże się z wystąpieniem psychopatologii. Problem ten ma złożony charakter. Najnowsze trendy mówią o tym, że funkcjonowanie organizmu jest wypadkową interakcji pomiędzy: (a) genotypem, (b) wczesnymi doświadczeniami życiowymi, w tym ELS, (c) doświadczeniami na dalszych etapach życia (Schmidt, 2011; Daskalakis et al., 2013). Powyższa interakcja leży u podstaw plastyczności adaptacyjnej przejawiającej się przez całe życie osobnika i odpowiadającej za podatność lub odporność na określony typ choroby. Zagadnienie to zostało szerzej omówione przeze mnie w pracy poglądowej (Chocyk et al., 2013b).

V. Znaczenie badań i ich ewentualne wykorzystanie

Podjęte badania i uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że ELS wywiera wpływ na procesy dojrzewania mózgu i jego funkcjonowanie na różnych etapach ontogenezy.

Należy podkreślić znamienne wpływy ELS na: (a) dojrzewanie SN i VTA, (b) procesy plastyczności synaptycznej w mPFC oraz (c) zachowanie zwierząt. Biorąc pod uwagę dane kliniczne wskazujące, że ELS zwiększa ryzyko różnych psychopatologii, szczególnie zaburzeń nastroju, zachowania, zaburzeń lękowych czy nadużywania substancji, otrzymane wyniki stanowią kolejny dowód na to, że ELS jest istotnym czynnikiem w etiologii wyżej wymienionych schorzeń. Ponadto, przedstawione badania przyczyniają się do poznania patomechanizmów tych psychopatologii. Wpływ zaburzeń plastyczności synaptycznej w obrębie mPFC na funkcjonowanie osobników z doświadczeniem ELS wydaje się być szczególnie ważnym zagadnieniem zapoczątkowującym przyszłe badania nad potencjalną interwencją terapeutyczną.

Na koniec, ważnym aspektem podjętych badań jest aspekt informacyjny i edukacyjny polegający na uświadomieniu opinii publicznej jak poważne i długotrwałe konsekwencje niesie ze sobą ELS z nadzieją, że zwiększy to uważność i wrażliwość nas wszystkich na przypadki maltretowania (psychicznego i fizycznego), zaniedbywania i wykorzystywania seksualnego dzieci i młodzieży.

Piśmiennictwo

- Acarin, L., Villapol, S., Faiz, M., Rohn, T.T., Castellano, B. & Gonzalez, B. (2007) Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia*, **55**, 954-965.
- Abraham, W.C. & Bear, M.F. (1996) Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, **19**, 126-130.
- Anastasia, A., Torre, L., de Erausquin, G.A. & Masco, D.H. (2009) Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **109**, 755-765.
- Andersen, S.L. & Teicher, M.H. (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci.*, **31**, 183-191.
- Andersen, S.L. & Teicher, M.H. (2009) Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **33**, 516-524.
- Bandeira, F., Lent, R. & Herculano-Houzel, S. (2009) Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 14108-14113.
- Bjorklund, A. & Dunnett, S.B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.*, **30**, 194-202.
- Brake, W.G., Zhang, T.Y., Diorio, J., Meaney, M.J. & Gratton, A. (2004) Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1863-1874.
- Braun, K., Lange, E., Metzger, M. & Poeggel, G. (2000) Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of Octodon degus. *Neuroscience*, **95**, 309-318.
- Brenhouse, H.C. (2013) Early Life Adversity Alters the Developmental Profiles of Addiction-Related Prefrontal Cortex Circuitry. *Brain Sci* 2013, 3:143-158.
- Brenhouse, H.C. & Andersen, S.L. (2011) Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 1687-1703.

- Burke, R.E. (2003) Postnatal developmental programmed cell death in dopamine neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 991, 69-79.
- Cao, J.P., Wang, H.J., Yu, J.K., Yang, H., Xiao, C.H. & Gao, D.S. (2008) Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neurosci. Res.*, 61, 390-397.
- Chakravarthy, V.S., Joseph, D. & Bapi, R.S. (2010) What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biol. Cybern.*, **103**, 237-253.
- Chao, C.C., Ma, Y.L., Chu, K.Y. & Lee, E.H. (2003) Integrin α and NCAM mediate the effects of GDNF on DA neuron survival, outgrowth, DA turnover and motor activity in rats. *Neurobiol. Aging*, 24, 105-116.
- *
- Chocyk, A., Dudys, D., Przyborowska, A., Mackowiak, M. & Wedzony, K. (2010) Impact of maternal separation on neural cell adhesion molecules expression in dopaminergic brain regions of juvenile, adolescent and adult rats. *Pharmacol. Rep.*, 62, 1218-1224.**
- Chocyk, A., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher, I., Mackowiak, M. & Wedzony, K. (2011a) Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience*, 173, 1-18.**
- Chocyk, A., Przyborowska, A., Dudys, D., Majcher, I., Mackowiak, M. & Wedzony, K. (2011b) The impact of maternal separation on the number of tyrosine hydroxylase-expressing midbrain neurons during different stages of ontogenesis. *Neuroscience*, 182, 43-61.**
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maslanka, I., Hess, G. & Wedzony, K. (2013a) Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.*, 38, 2089-2107.**
- Chocyk, A., Majcher-Maslanka, I., Dudys, D., Przyborowska, A. & Wedzony, K. (2013b) Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions - a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. *Pharmacol. Rep.*, 65, 1462-1470.**
- Chocyk, A., Przyborowska, A., Makuch, W., Majcher-Maslanka, I., Dudys, D. & Wedzony, K. (2014) The effects of early-life adversity on fear memories in adolescent rats and their persistence into adulthood. *Behav. Brain Res.*, 264, 161-172.**
- Cirulli, F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E. & Suomi, S.J. (2009) Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 33, 573-585.
- Dash, P.K., Blum, S. & Moore, A.N. (2000) Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport*, 11, 2811-2816.
- Daskalakis, N.P., Bagot, R.C., Parker, K.J., Vinkers, C.H. & de Kloet, E.R. (2013) The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*.
- de Kloet, E.R., Sibug, R.M., Helmerhorst, F.M. & Schmidt, M.V. (2005) Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29, 271-281.
- Dillon, D.G., Holmes, A.J., Birk, J.L., Brooks, N., Lyons-Ruth, K. & Pizzagalli, D.A. (2009) Childhood adversity is associated with left basal ganglia dysfunction during reward anticipation in adulthood. *Biol. Psychiatry*, **66**, 206-213.
- Ditlevsen, D.K., Povlsen, G.K., Berezin, V. & Bock, E. (2008) NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J. Neurosci. Res.*, 86, 727-743
- Drevets, W.C., Price, J.L. & Furey, M.L. (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.*, **213**, 93-118.
- Faure, J., Stein, D.J. & Daniels, W. (2009) Maternal separation fails to render animals more susceptible to methamphetamine-induced conditioned place preference. *Metab Brain Dis.*, 24, 541-559.
- Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.*, 22, 7840-7843.
- Frielingsdorf, H., Schwarz, K., Brundin, P. & Mohapel, P. (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 10177-10182.

* Wszystkie zamieszczone w spisie prace autorstwa Chocyk et al. wchodzą w skład osiągnięcia naukowego

- Giachino, C., Canalia, N., Capone, F., Fasolo, A., Alleva, E., Riva, M.A., Cirulli, F. & Peretto, P. (2007) Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. *Neuroscience*, **145**, 568-578.
- Green, J.G., McLaughlin, K.A., Berglund, P.A., Gruber, M.J., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M. & Kessler, R.C. (2010) Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, **67**, 113-123.
- Gulyaeva, N.V., Kudryashov, I.E. & Kudryashova, I.V. (2003) Caspase activity is essential for long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.*, **73**, 853-864.
- Gunnar, M.R. & Donzella, B. (2002) Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*, **27**, 199-220.
- Hall, F.S., Wilkinson, L.S., Humby, T. & Robbins, T.W. (1999) Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. *Synapse*, **32**, 37-43.
- Hanson, J.L., Chung, M.K., Avants, B.B., Rudolph, K.D., Shirtcliff, E.A., Gee, J.C., Davidson, R.J. & Pollak, S.D. (2012) Structural variations in prefrontal cortex mediate the relationship between early childhood stress and spatial working memory. *J. Neurosci.*, **32**, 7917-7925.
- Hayes, J.P., Hayes, S.M. & Mikedis, A.M. (2012) Quantitative meta-analysis of neural activity in posttraumatic stress disorder. *Biol. Mood. Anxiety. Disord.*, **2**, 9.
- Haynes, W.I. & Mallet, L. (2010) High-frequency stimulation of deep brain structures in obsessive-compulsive disorder: the search for a valid circuit. *Eur. J. Neurosci.*, **32**, 1118-1127.
- Heidbreder, C.A. & Groenewegen, H.J. (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 555-579.
- Henry, C., Guegant, G., Cador, M., Arnauld, E., Arsaut, J., Le, M.M. & Demotes-Mainard, J. (1995) Prenatal stress in rats facilitates amphetamine-induced sensitization and induces long-lasting changes in dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, **685**, 179-186.
- Hulshof, H.J., Novati, A., Sgoifo, A., Luiten, P.G., den Boer, J.A. & Meerlo, P. (2011) Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.*, **216**, 552-560.
- Hung, S.Y., Liou, H.C., Kang, K.H., Wu, R.M., Wen, C.C. & Fu, W.M. (2008) Overexpression of heme oxygenase-1 protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, **74**, 1564-1575.
- Johnson, M.H. (2003) Development of human brain functions. *Biol. Psychiatry*, **54**, 1312-1316.
- Katunar, M.R., Saez, T., Brusco, A. & Antonelli, M.C. (2009) Immunocytochemical expression of dopamine-related transcription factors Pitx3 and Nurr1 in prenatally stressed adult rats. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1014-1022.
- Katunar, M.R., Saez, T., Brusco, A. & Antonelli, M.C. (2010) Ontogenetic expression of dopamine-related transcription factors and tyrosine hydroxylase in prenatally stressed rats. *Neurotox. Res.*, **18**, 69-81.
- Kessler, R.C., McLaughlin, K.A., Green, J.G., Gruber, M.J., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., Aguilar-Gaxiola, S., Alhamzawi, A.O., Alonso, J., Angermeyer, M., Benjet, C., Bromet, E., Chatterji, S., de, G.G., Demyttenaere, K., Fayyad, J., Florescu, S., Gal, G., Gureje, O., Haro, J.M., Hu, C.Y., Karam, E.G., Kawakami, N., Lee, S., Lepine, J.P., Ormel, J., Posada-Villa, J., Sagar, R., Tsang, A., Ustun, T.B., Vassilev, S., Viana, M.C. & Williams, D.R. (2010) Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *Br. J. Psychiatry*, **197**, 378-385.
- Kikusui, T., Faccidomo, S. & Miczek, K.A. (2005) Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **178**, 202-210.
- Kippin, T.E., Szumlinski, K.K., Kapasova, Z., Reznier, B. & See, R.E. (2008) Prenatal stress enhances responsiveness to cocaine. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 769-782.
- Knott, C., Stern, G., Kingsbury, A., Welcher, A.A. & Wilkin, G.P. (2002) Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism. Relat Disord.*, **8**, 329-341.
- Kosten, T.A., Zhang, X.Y. & Kehoe, P. (2005) Neurochemical and behavioral responses to cocaine in adult male rats with neonatal isolation experience. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 661-667.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C.A. & Feldon, J. (2000) Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.*, **114**, 1119-1130.

- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. & Vandennebeele, P. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death. Differ.*, **14**, 44-55.
- Lehmann, J., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Stohr, T., Pothuizen, H.H. & Feldon, J. (2002) Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiol. Aging*, **23**, 457-466
- Levine, S., Chevalier, J.A. & Korchin, S.J. (1956) The effects of early shock and handling on later avoidance learning. *J. Pers.*, **24**, 475-493.
- Levine, S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav.*, **73**, 255-260.
- Likhtik, E., Stujenske, J.M., Topiwala, A., Harris, A.Z. & Gordon, J.A. (2013) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nat. Neurosci.*
- Lisboa, S.F., Stecchini, M.F., Correa, F.M., Guimaraes, F.S. & Resstel, L.B. (2010) Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*, **171**, 760-768.
- Lisman, J., Schulman, H. & Cline, H. (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 175-190.
- Liu, W., Tang, Y. & Feng, J. (2011) Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.*, **89**, 141-146.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Dudys, D. & Wedzony, K. (2009) Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. *Neuroscience*, **158**, 1708-1716.
- Macri, S., Mason, G.J. & Wurbel, H. (2004) Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 1017-1024.
- Marek, R., Strobel, C., Bredy, T.W. & Sah, P. (2013) The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J. Physiol*, **591**, 2381-2391.
- Matthews, S.G. (2001) Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin. Neonatol.*, **6**, 309-317.
- Matthews, K., Robbins, T.W., Everitt, B.J. & Caine, S.B. (1999) Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **141**, 123-134.
- McCormick, C.M., Kehoe, P. & Kovacs, S. (1998) Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **16**, 175-185.
- McLaughlin, B., Hartnett, K.A., Erhardt, J.A., Legos, J.J., White, R.F., Barone, F.C. & Aizenman, E. (2003) Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 715-720.
- Meaney, M.J., Brake, W. & Gratton, A. (2002) Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, **27**, 127-138.
- Mehta, M. & Schmauss, C. (2011) Strain-specific cognitive deficits in adult mice exposed to early life stress. *Behav. Neurosci.*, **125**, 29-36.
- Miller, M.M., Morrison, J.H. & McEwen, B.S. (2012) Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. *Behav. Brain Res.*, **229**, 280-288.
- Moffett, M.C., Harley, J., Francis, D., Sanghani, S.P., Davis, W.I. & Kuhar, M.J. (2006) Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 1210-1218.
- Moffett, M.C., Vicentic, A., Kozel, M., Plotsky, P., Francis, D.D. & Kuhar, M.J. (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 321-330.
- Mooney, S.M. & Miller, M.W. (2000) Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **123**, 103-117.
- Myers-Schulz, B. & Koenigs, M. (2012) Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Mol. Psychiatry*, **17**, 132-141.
- Noyan-Ashraf, M.H., Brandizzi, F. & Juurlink, B.H. (2005) Constitutive nuclear localization of activated caspase 3 in subpopulations of the astroglial family of cells. *Glia*, **49**, 588-593.

- O'Malley, D., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2010) Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsivity of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Oo, T.F., Marchionini, D.M., Yarygina, O., O'Leary, P.D., Hughes, R.A., Kholodilov, N. & Burke, R.E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor regulates early postnatal developmental cell death of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *Mol. Cell Neurosci.*, 41, 440-447.
- Oomman, S., Finckbone, V., Dertien, J., Attridge, J., Henne, W., Medina, M., Mansouri, B., Singh, H., Strahlendorf, H. & Strahlendorf, J. (2004) Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis. *J. Comp Neurol.*, 476, 154-173.
- Oomman, S., Finckbone, V., Dertien, J., Attridge, J., Henne, W., Medina, M., Mansouri, B., Singh, H., Strahlendorf, H. & Strahlendorf, J. (2004) Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis. *J. Comp Neurol.*, 476, 154-173.
- Orme, R., Fricker-Gates, R.A. & Gates, M.A. (2009) Ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *J. Neural Transm. Suppl*, 3-18.
- Oswald, L.M., Wand, G.S., Kuwabara, H., Wong, D.F., Zhu, S. & Brasic, J.R. (2014) History of childhood adversity is positively associated with ventral striatal dopamine responses to amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Pavlov, I.P. Conditioned reflexes. Oxford press; 1927.
- Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M. & Roberts, R.C. (2010) Basal ganglia pathology in schizophrenia: dopamine connections and anomalies. *J. Neurochem.*, 113, 287-302.
- Pfrieger, F.W. (2010) Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res. Rev.*, 63, 39-46.
- Ploj, K., Roman, E. & Nylander, I. (2003) Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*, 121, 787-799.
- Pruessner, J.C., Champagne, F., Meaney, M.J. & Dagher, A. (2004) Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [¹¹C]raclopride. *J. Neurosci.*, 24, 2825-2831.
- Pryce, C.R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A.C. & Feldon, J. (2002) Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. *News Physiol Sci.*, 17, 150-155.
- Quirk, G.J., Pare, D., Richardson, R., Herry, C., Monfils, M.H., Schiller, D. & Vicentic, A. (2010) Erasing fear memories with extinction training. *J. Neurosci.*, 30, 14993-14997.
- Rinne-Albers, M.A., van der Wee, N.J., Lamers-Winkelmann, F. & Vermeiren, R.R. (2013) Neuroimaging in children, adolescents and young adults with psychological trauma. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*.
- Rodrigues, A.J., Leao, P., Carvalho, M., Almeida, O.F. & Sousa, N. (2011) Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 214, 107-120.
- Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H. & Glass, C.K. (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*, 137, 47-59.
- Schmidt, M.V. (2011) Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 330-338.
- Schmidt, M.V., Abraham, W.C., Maroun, M., Stork, O. & Richter-Levin, G. (2013) Stress-induced metaplasticity: from synapses to behavior. *Neuroscience*, 250, 112-120.
- Schultz, W. (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 259-288.
- Seth, P. & Koul, N. (2008) Astrocyte, the star avatar: redefined. *J. Biosci.*, 33, 405-421.
- Shan, X., Chi, L., Bishop, M., Luo, C., Lien, L., Zhang, Z. & Liu, R. (2006) Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells*, 24, 1280-1287.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N. & Quirk, G.J. (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 36, 529-538.

- Smeyne, M., Jiao, Y., Shepherd, K.R. & Smeyne, R.J. (2005) Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice. *Glia*, **52**, 144-152.
- Sotres-Bayon, F., Sierra-Mercado, D., Pardilla-Delgado, E. & Quirk, G.J. (2012) Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron*, **76**, 804-812.
- Teicher, M.H., Andersen, S.L., Polcari, A., Anderson, C.M., Navalta, C.P. & Kim, D.M. (2003) The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 33-44.
- Teismann, P. & Schulz, J.B. (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res.*, **318**, 149-161.
- Togashi, H., Sakisaka, T. & Takai, Y. (2009) Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh. Migr.*, **3**, 29-35.
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobar, T., Otsuki, K., Yamagata, H., McEwen, B.S. & Watanabe, Y. (2010) Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.*, **30**, 15007-15018.
- Van den Heuvel, D.M. & Pasterkamp, R.J. (2008) Getting connected in the dopamine system. *Prog. Neurobiol.*, **85**, 75-93.
- van Harmelen, A.L., van Tol, M.J., van der Wee, N.J., Veltman, D.J., Aleman, A., Spinhoven, P., van Buchem, M.A., Zitman, F.G., Penninx, B.W. & Elzinga, B.M. (2010) Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Biol. Psychiatry*, **68**, 832-838.
- van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Whelan, T. & LEVINE, S. (1998) Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J. Neurosci.*, **18**, 10171-10179.
- Vazquez, V., Penit-Soria, J., Durand, C., Besson, M.J., Giros, B. & Dauge, V. (2006) Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. *Behav. Brain Res.*, **170**, 211-218.
- Wang, L., Jiao, J. & Dulawa, S.C. (2011) Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **216**, 207-218.
- Wang, L., Paul, N., Stanton, S.J., Greeson, J.M. & Smoski, M.J. (2013) Loss of sustained activity in the ventromedial prefrontal cortex in response to repeated stress in individuals with early-life emotional abuse: implications for depression vulnerability. *Front Psychol.*, **4**, 320.
- Wu, X., Chen, P.S., Dallas, S., Wilson, B., Block, M.L., Wang, C.C., Kinyamu, H., Lu, N., Gao, X., Leng, Y., Chuang, D.M., Zhang, W., Lu, R.B. & Hong, J.S. (2008) Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **11**, 1123-1134.
- Zecevic, N. & Verney, C. (1995) Development of the catecholamine neurons in human embryos and fetuses, with special emphasis on the innervation of the cerebral cortex. *J. Comp Neurol.*, **351**, 509-535.
- Zhao, M. & Janson Lang, A.M. (2009) Bromodeoxyuridine infused into the cerebral ventricle of adult mice labels nigral neurons under physiological conditions--a method to detect newborn nerve cells in regions with a low rate of neurogenesis. *J. Neurosci. Methods*, **184**, 327-331.
- Xiao, M.F., Xu, J.C., Tereshchenko, Y., Novak, D., Schachner, M. & Kleene, R. (2009) Neural cell adhesion molecule modulates dopaminergic signaling and behavior by regulating dopamine D2 receptor internalization. *J. Neurosci.*, **29**, 14752-14763.
-

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

a) Autorstwo/współautorstwo w publikacjach naukowych.

Mój dorobek naukowy to 75 publikacji naukowych (**IF: 98.037; MNiSW: 669; h-index: 15**) w tym:

- 21 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora (**IF: 59.195; MNiSW: 459**)
- 17 prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora (**IF: 38.842; MNiSW: 210**)
- 37 komunikatów zjazdowych

b) Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.

Kierowałam dwoma projektami badawczymi:

- Zadanie badawcze nr 2.1.: „Zmiany plastyczne kory mózgu jako czynnik ryzyka zapadalności na choroby schizoafektywne”, 2010-2014, w ramach projektu "Depresja – mechanizmy – terapia" (DeMeTer), POIG.01.01.02-12-004/09-00, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013
- Wpływ wczesnego stresu (izolacja od matki) na dojrzewanie układu dopaminowego i jego funkcjonowanie w wieku młodzieńczym i dorosłym. Nr N401 154 31/3361, 2006-2009, MNiSW

W latach 2000 – 2013 byłam również **wykonawcą** w co najmniej 8 innych projektach.

c) Nagrody za działalność naukową

- Wyróżnienie pracy doktorskiej, 2005, Rada Naukowa Instytutu Farmakologii PAN
- Nagrody zespołowe za wyróżniające się prace opublikowane w roku 2013, 2008, 2003 i 2002, Dyrektor Instytutu Farmakologii PAN
- Wyróżnienie abstraktu: **Chocyk A.**, Czyrak A., Maćkowiak M., Fijał K., Wędzony K. Presence of dopamine D1 receptors in the rat paraventricular nucleus of the

hypothalamus and their putative role in regulation of endocrine system - anatomical and functional evidence, 2002, European College of Neuropsychopharmacology (ECNP). Zaproszenie do wygłoszenia referatu na 15 Kongresie ECNP, Barcelona, 5-9 Październik 2002

d) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

- Pharmacological Reports (dawniej Polish Journal o Pharmacology), od 2005 do chwili obecnej, około 4 recenzje
- International Journal of Developmental Neuroscience, 06-10.2013, 2 recenzje
- Neuroscience, 07.2011, 1 recenzja

e) Przebieg pracy naukowej – kluczowe etapy

Pracę w Zakładzie Farmakologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie rozpoczęłam w styczniu 1997 roku, początkowo na etacie inżyniersko-technicznym, a następnie po upływie roku awansowałam na stanowisko Asystenta. Dołączyłam do zespołu badawczego kierowanego wówczas przez dr Krzysztofa Wędrzonego i dr Annę Czyrak. Odbyte studia magisterskie i praca dyplomowa wykonana w Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej UJ, pod opieką promotorską prof. dr hab. Jana Potempy, stały się na początku mojej pracy zawodowej dużym atutem, dysponowałam bowiem wiedzą i doświadczeniem z zakresu zastosowania przeciwciał jako narzędzi do badania ekspresji białek oraz znajomością nowoczesnych metod biologii molekularnej. Metody te (w tamtym okresie czasu i w warunkach rozwijającej się nauki polskiej) dopiero zaczęto wprowadzać na szeroką skalę do badań nad mózgiem. Przykładowo, byłam jedną z pierwszych osób, które wprowadziły metodę Western blot do rutynowych badań w Instytucie. Pierwsze prace badawcze, w które zostałam zaangażowana dotyczyły: (a) dystrybucji komórkowej i strukturalnej receptorów dopaminowych i serotoninowych w różnych obszarach mózgu (badanej za pomocą metod immunohistochemicznych) oraz (b) pomiaru ekspresji tychże receptorów metodą Western blot (Mackowiak et al., 1999; Czyrak et al., 2000; Wędrzony et al., 2000). Szczególne miejsce w moim życiu zawodowym zajmuje projekt

dotyczący lokalizacji receptorów dopaminowych D4 w korze mózgu (Wedzony et al., 2000), gdyż to w jego trakcie „złapałam bakcyła” pracy naukowej. Wtedy to po raz pierwszy samodzielnie wykonywałam analizę mikroskopową preparatów, zdjęcia, fenotypowanie komórek wykazujących ekspresję receptorów D4 (jeszcze bez możliwości wykorzystania mikroskopii fluorescencyjnej do badań). To wszystko uświadomiło mi jak dużo trudu i zaangażowania wymaga uzyskanie rzetelnego wyniku. Publikacja będąca owocem tych badań (Wedzony et al., 2000) jest do tej pory najliczniej cytowaną pracą w moim dorobku (69 cytowań wg *Web of Science* na dzień 20.05.2014).

Miałam duże szczęście i przywilej pracować w prężnym i kreatywnym zespole (przekształconym później w samodzielną Pracownię Farmakologii i Biostruktury Mózgu kierowaną przez prof. dr hab. Krzysztofa Wędzonę). Mnogość nowoczesnych metod (zarówno biochemicznych jak i behawioralnych) oraz tematów badawczych umożliwiła mi zdobycie szerokiej wiedzy w dziedzinie neuropsychofarmakologii. W trakcie ponad 16-to letniej pracy naukowej, obok przygotowania pracy doktorskiej i habilitacyjnej miałam możliwość uczestniczenia w wielu projektach badawczych Pracowni; do najważniejszych należały:

- Rola glikokortykoidów w regulacji układu dopaminowego i serotoninowego (Czyrak et al., 1997; Czyrak & Chocyk, 2001; Czyrak et al., 2002; 2003b; 2003c)
- Postnatalna blokada receptorów NMDA jako model schizofrenii (Wedzony et al., 2005; 2008b; 2008c)
- Rola receptorów serotoninowych 5HT1A i 5HT2A w regulacji funkcji komórek kory mózgu (Czyrak et al., 2003a; Wedzony et al., 2007; 2008a)
- Neuronalne białko adhezji komórkowej PSA-NCAM jako marker zmian plastycznych dorosłego mózgu wywołanych czynnikami farmakologicznymi (Mackowiak et al., 2007; 2008; 2009a; 2009b)

Ponadto, miałam też możliwość współpracy i dzielenia się zdobytym doświadczeniem z innymi Zakładami (Labuz et al., 2003; Wedzony et al., 2003; Ziolkowska et al., 2005; Starowicz et al., 2009)

Pracę doktorską wykonałam w ramach obowiązków Asystenta; w tym okresie czasu w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie nie było Studiów Doktoranckich. W dysertacji doktorskiej podjęłam problem roli receptorów dopaminowych rodziny D1 w regulacji funkcji neuronów jądra przykomorowego podwzgórza (PVN) w warunkach

podstawowych i po podaniu kokainy. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. Krzysztof Wędzony, zaś recenzentami, prof. dr hab. Adam Płaźnik i prof. dr hab. Władysław Lasoń. Część eksperymentalna pracy wykonana była z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych i Western blot. Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem, w lutym 2005 roku wykazując, że:

- Receptory dopaminowe D1 występują w PVN a ich anatomiczne i komórkowe rozmieszczenie w badanej strukturze wskazuje na możliwość bezpośredniej regulacji układu neurohormonalnego przez te receptory (**Czyrak et al., 2000**)
- Receptory dopaminowe podrodziny D1 mogą wpływać na aktywność neuronów PVN, mierzoną indukcją białek cFos. Wykazano to dla neuronów CRH i oksytocynowych, jednakże pobudzenie receptorów podrodziny D1 aktywuje znacznie więcej populacji komórek PVN, niż te przebadane w niniejszej pracy. Otrzymane wyniki stanowią anatomiczny dowód na to, że transmisja dopaminergiczna poprzez receptory podrodziny D1 może modulować wiele funkcji PVN. Obok regulowania uwalniania CRH i oksytocyny, receptory dopaminowe podrodziny D1 mogą potencjalnie brać udział w integracji sygnałów dochodzących do PVN i z niego wychodzących, a tym samym mogą uczestniczyć w procesach utrzymywania homeostazy (**Chocyk et al., 2008**)
- Kokaina wywołuje krótkotrwałe i długotrwałe zmiany w aktywności neuronów PVN, przejawiające się zwiększoną ekspresją odpowiednio: białek cFos i FosB/ Δ FosB. Długotrwałe zmiany w aktywności neuronów PVN wywołane wielokrotnymi podaniami kokainy wiążą się z akumulacją stabilnych form Δ FosB, co może leżeć u podłoża trwałych zmian adaptacyjnych. Indukcja i akumulacja Δ FosB zachodziła w komórkach CRH i wielu innych niezbadanych w tej pracy. Powyższe obserwacje mogą mieć duże znaczenie w zrozumieniu molekularnych podstaw procesu allostazy i wzmacniać hipotezę o zaangażowaniu systemu CRH pochodzącego z PVN w inicjację i utrzymanie procesu uzależnienia od kokainy (**Chocyk et al., 2006**)
- Receptory dopaminowe podrodziny D1 mogą uczestniczyć w powstawaniu w neuronach PVN potencjalnych zmian adaptacyjnych wywołanych wielokrotnymi podaniami kokainy (**Chocyk et al., 2006**)
- Kokaina może powodować powstawanie zmian adaptacyjnych również w receptorach dopaminowych podrodziny D1 regulujących aktywność PVN. Powyższe zmiany polegają na utrzymaniu, w trakcie wielokrotnych podań kokainy, odpowiedzi

związanej z aktywacją tych receptorów na poziomie charakterystycznym dla jednorazowych podań tej substancji. Stan ten może być przejawem allostazy zachodzącej w organizmie pod wpływem długotrwałej ekspozycji na działanie kokainy i może mieć duże znaczenie w procesie utrzymania uzależnienia od kokainy **(Chocyk et al., 2008)**

Reasumując, wyniki mojej pracy doktorskiej zwróciły uwagę na ważną rolę transmisji dopaminergicznej i receptorów dopaminowych podrodziny D1 w regulacji aktywności PVN. Zasugerowały też, że wszelkie zaburzenia w podwzgórzowym systemie dopaminowym, będące wynikiem choroby bądź przyjmowania substancji wpływających na przekazywanie dopaminergiczne, w tym na receptory dopaminowe, mogą prowadzić do zmian w funkcjonowaniu PVN i tym samym przyczynić się do zachwiania homeostazy i wejścia organizmu w stan allostazy.

Po obronie dysertacji moje zainteresowania naukowe pozostały w kręgu tematycznym dotyczącym interakcji pomiędzy układem dopaminowym a osią podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Zaczęłam interesować się modelami zwierzęcymi umożliwiającymi badanie wczesnego wpływu glikokortykoidów bądź zaburzeń osi HPA na rozwój układu dopaminowego, np. okołourodzeniowymi podaniami deksametazonu (Wedzony et al., 2009). Wzrastająca ilość doniesień literaturowych o wpływie stresu we wczesnym okresie życia (ELS) na ryzyko różnych psychopatologii związanych z dysfunkcjami układu dopaminowego skłoniła mnie do zajęcia się w szczególności modelowaniem ELS u gryzoni. W styczniu 2006 roku zostałam awansowana na stanowisko Adiunkta zaś we wrześniu 2006 roku otrzymałam swój pierwszy samodzielny grant badawczy zatytułowany: *Wpływ wczesnego stresu (izolacja od matki) na dojrzewanie układu dopaminowego i jego funkcjonowanie w wieku młodzieńczym i dorosłym* (Nr N401 154 31/3361, 2006-2009, MNiSW). Grant ten umożliwił mi rozpoczęcie na szeroką skalę badań w modelu separacji osesków od matek (MS). Interesujący temat i pierwsze wyniki, posiadanie funduszy na badania oraz dostępność do najnowocześniejszego sprzętu i metod w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie skłoniły mnie do zaangażowania się w pracę naukową na miejscu i rezygnacji z wyjazdu na stypendium/staż do innego ośrodka. Kolejne granty, tym razem dotyczące wpływu ELS na funkcję kory przedczołowej, (Nr N401 144538, 2010-2013, MNiSW) oraz "Depresja - mechanizmy - terapia" (POIG.01.01.02-12-004/09-00, 2010-2014, projekt współfinansowany przez UE) umożliwiły mi kontynuację badań i przygotowanie rozprawy habilitacyjnej.



Piśmiennictwo dotyczące punktu 5e

- Chocyk, A., Czyrak, A. & Wedzony, K. (2006) Acute and repeated cocaine induces alterations in FosB/DeltaFosB expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.*, **1090**, 58-68.
- Chocyk, A., Czyrak, A. & Wedzony, K. (2008) Dopamine D1-like receptors agonist SKF 38393 increases cFOS expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus--impact of acute and chronic cocaine. *J. Physiol Pharmacol.*, **59**, 425-440.
- Czyrak, A. & Chocyk, A. (2001) Search for the presence of glucocorticoid receptors in dopaminergic neurons of rat ventral tegmental area and substantia nigra. *Pol. J. Pharmacol.*, **53**, 681-684.
- Czyrak, A., Chocyk, A., Mackowiak, M., Fijal, K. & Wedzony, K. (2000) Distribution of dopamine D1 receptors in the nucleus paraventricularis of the hypothalamus in rats: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **85**, 209-217.
- Czyrak, A., Czepiel, K., Mackowiak, M., Chocyk, A. & Wedzony, K. (2003a) Serotonin 5-HT1A receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res.*, **989**, 42-51.
- Czyrak, A., Mackowiak, M., Chocyk, A., Fijal, K., Gadek-Michalska, A. & Wedzony, K. (2003b) 8-OHDPAT-induced disruption of prepulse inhibition in rats is attenuated by prolonged corticosterone treatment. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1300-1310.
- Czyrak, A., Mackowiak, M., Chocyk, A., Fijal, K., Tokarski, K., Bijak, M. & Wedzony, K. (2002) Prolonged corticosterone treatment alters the responsiveness of 5-HT1A receptors to 8-OH-DPAT in rat CA1 hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **366**, 357-367.
- Czyrak, A., Mackowiak, M., Chocyk, A., Fijal, K. & Wedzony, K. (2003c) Role of glucocorticoids in the regulation of dopaminergic neurotransmission. *Pol. J. Pharmacol.*, **55**, 667-674.
- Czyrak, A., Mackowiak, M., Fijal, K., Chocyk, A. & Wedzony, K. (1997) Impact of metyrapone on MK-801-induced alterations in the rat dopamine D1 receptors. *Pol. J. Pharmacol.*, **49**, 305-316.
- Labuz, D., Chocyk, A., Wedzony, K., Toth, G. & Przewlocka, B. (2003) Endomorphin-2, deltorphin II and their analogs suppress formalin-induced nociception and c-Fos expression in the rat spinal cord. *Life Sci.*, **73**, 403-412.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Dudys, D. & Wedzony, K. (2009a) Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. *Neuroscience*, **158**, 1708-1716.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Fijal, K., Czyrak, A. & Wedzony, K. (1999) c-Fos proteins, induced by the serotonin receptor agonist DOI, are not expressed in 5-HT2A positive cortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **71**, 358-363.
- Mackowiak, M., Chocyk, A., Markowicz-Kula, K. & Wedzony, K. (2007) Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Res.*, **1148**, 43-52.
- Mackowiak, M., Dudys, D., Chocyk, A. & Wedzony, K. (2009b) Repeated risperidone treatment increases the expression of NCAM and PSA-NCAM protein in the rat medial prefrontal cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **19**, 125-137.
- Mackowiak, M., Grzegorzewska, M., Budziszewska, B., Chocyk, A., Hess, G. & Wedzony, K. (2008) Cocaine decreases the expression of PSA-NCAM protein and attenuates long-term potentiation via glucocorticoid receptors in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 2928-2937.
- Starowicz, K., Mousa, S.A., Obara, I., Chocyk, A., Przewlocki, R., Wedzony, K., Machelska, H. & Przewlocka, B. (2009) Peripheral antinociceptive effects of MC4 receptor antagonists in a rat model of neuropathic pain - a biochemical and behavioral study. *Pharmacol. Rep.*, **61**, 1086-1095.
- Wedzony, K., Chocyk, A., Kolasiewicz, W. & Mackowiak, M. (2007) Glutamatergic neurons of rat medial prefrontal cortex innervating the ventral tegmental area are positive for serotonin 5-HT1A receptor protein. *J. Physiol Pharmacol.*, **58**, 611-624.
- Wedzony, K., Chocyk, A. & Mackowiak, M. (2008a) A search for colocalization of serotonin 5-HT2A and 5-HT1A receptors in the rat medial prefrontal and entorhinal cortices--immunohistochemical studies. *J. Physiol Pharmacol.*, **59**, 229-238.
- Wedzony, K., Chocyk, A., Mackowiak, M., Fijal, K. & Czyrak, A. (2000) Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain--immunocytochemical study. *J. Physiol Pharmacol.*, **51**, 205-221.
- Wedzony, K., Fijal, K. & Chocyk, A. (2005) Blockade of NMDA receptors in postnatal period decreased density of tyrosine hydroxylase immunoreactive axonal arbors in the medial prefrontal cortex of adult rats. *J. Physiol Pharmacol.*, **56**, 205-221.
- Wedzony, K., Fijal, K., Mackowiak, M. & Chocyk, A. (2008b) Detrimental effect of postnatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptors on sensorimotor gating is reversed by neuroleptic drugs. *Pharmacol. Rep.*, **60**, 856-864.

- Wedzony, K., Fijal, K., Mackowiak, M., Chocyk, A. & Zajaczkowski, W. (2008c) Impact of postnatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptors on rat behavior: a search for a new developmental model of schizophrenia. *Neuroscience*, **153**, 1370-1379.
- Wedzony, K., Koros, E., Czyrak, A., Chocyk, A., Czepiel, K., Fijal, K., Mackowiak, M., Rogowski, A., Kostowski, W. & Bienkowski, P. (2003) Different pattern of brain c-Fos expression following re-exposure to ethanol or sucrose self-administration environment. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **368**, 331-341.
- Wedzony, K., Markowicz-Kula, K., Chocyk, A., Fijal, K., Przyborowska, A. & Mackowiak, M. (2009) Impact of postnatal dexamethasone on psychotomimetic effects of MK-801 measured on adult rats. *Pharmacol. Rep.*, **61**, 1034-1041.
- Ziolkowska, B., Gieryk, A., Bilecki, W., Wawrzczak-Bargiela, A., Wedzony, K., Chocyk, A., Danielson, P.E., Thomas, E.A., Hilbush, B.S., Sutcliffe, J.G. & Przewlocki, R. (2005) Regulation of alpha-synuclein expression in limbic and motor brain regions of morphine-treated mice. *J. Neurosci.*, **25**, 4996-5003.

Almwyk