Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

Anna Maria Ronowska

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2020

1. **Imię i nazwisko**

   Anna Maria Ronowska

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

   25.06.2003 – tytuł magistra biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

   2003-2008 – studia doktoranckie w Akademii Medycznej w Gdańsku w zakresie biologii medycznej

   24.04.2008 – tytuł doktora nauk medycznych w dziedzinie biologii medycznej, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny. Rozprawa doktorska: Zależna od fenotypu i genotypu podatność komórek cholinergicznych na bodźce cytotoksyczne i cytoprotekcyjne. Promotor: prof. dr hab. Andrzej Szutowicz

   2017-2019 – zawodowe studia podyplomowe w zakresie Analityki Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych**

   11.2007-03.2010 – asystent, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

   04.2010-obecnie – adiunkt, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy**

   Tytuł osiągnięcia:

   Enzymy metabolizmu acetylo-CoA i cytrynianu jako cel sygnałów neurotoksycznych w degeneracji neuronów cholinergicznych

4.1 Wprowadzenie

Mózg jest tkanką cechującą się najbardziej zróżnicowaną strukturą morfologiczną, metaboliczną i czynnościową spośród wszystkich tkanek organizmu. Wynika to z istnienia różnorodnych klas komórek nerwowych wydzielających kilkadziesiąt związków neuroprzekaźnikowych i modulujących wzajemnie własną aktywność poprzez połączenia synaptyczne. O wysokiej złożoności strukturalnej funkcji neuroprzekaźniczych u człowieka świadczy obecność kilku do kilkunastu tysięcy połączeń synaptycznych w jednej komórce nerwowej. Różnorodność wykazują również różne klasy komórek astroglejowych, mikroglejowych i oligodendroglejowych, które

odpowiednio wspomagają metabolizm energetyczny neuronów i ich funkcje neuroprzekaźnicze; pełnią role nadzoru immunologicznego, czy też zapewniają fizyczną osłonę dla procesów neuroprzewodnictwa aksonalnego.

Mózg w stosunku do swojej masy wytwarza i zużywa relatywnie wielokrotnie więcej energii, niż tkanki obwodowe. W warunkach spoczynkowych mózg, stanowiąc jedynie 2% masy ciała, metabolizuje 20% ogólnoustrojowej puli glukozy. Z kolei neurony zużywają największą, bo około 70% frakcję glukozy transportowanej do przestrzeni pozakomórkowych mózgu (Rolfe and Brown 1997). Zapotrzebowanie bogatej w neurony istoty szarej na ATP wynosi 30 µmoli ATP/gram tkanki/minutę co porównać można do zapotrzebowania na ten metabolit miocytów mięśni nóg w trakcie maratonu. Wysokie tempo metabolizmu energetycznego w neuronach jest dostosowane do ich funkcji neuroprzekaźniczych odbywających się z szybkością od 10-50 cykli depolaryzacji/repolaryzacji w ciągu sekundy. Powoduje to wysoką wrażliwość neuronów na hipoksję/anoksję, hipoglikemię oraz wiele innych czynników neurotoksycznych hamujących metabolizm energetyczny.

W warunkach spoczynkowych ponad 95% energii jest generowane w postaci ATP w mitochondriach przez utlenienie pirogronianu pochodzącego z glikolitycznej przemiany glukozy, w reakcjach katalizowanych przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC) oraz enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych (TCA) i łańcucha oddechowego. W związku z tym aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm tlenowy jest w mózgu znacznie wyższa niż w tkankach obwodowych (Hamberger i Hyden 1963; Bouzier-Sore i wsp. 2006; Lebon i wsp. 2002; Bélanger, Allaman, and Magistretti 2011). Etapem łączącym glikolizę z metabolizmem oksydacyjnym jest PDHC w mitochondriach, katalizujący oksydacyjną dekarboksylację pirogronianu do acetylo-CoA, który następnie jest zużywany w cyklu kwasów trójkarboksylowych sprzężonym z łańcuchem oddechowym. Wysoka aktywność PDHC, szczególnie w neuronach, zapewnia utrzymanie odpowiedniej do potrzeb syntezy głównej puli mitochondrialnego acetylo-CoA pochodzącej z glikolitycznej przemiany glukozy. Tak więc acetylo-CoA należy traktować jako bezpośredni prekursor cyklu TCA (Szutowicz i wsp. 2013). Około 2% acetylo-CoA jest zużywanych do zachodzącej wyłącznie w mitochondriach wszystkich neuronów syntezy N-acetylo-asparaginianu. Oprócz tego kilku procentowa frakcja acetylo-CoA jest transportowana z mitochondriów i zużywana w kilkuset reakcjach acetylacji zlokalizowanych we wszystkich pozostałych kompartmentach wewnątrz neuronalnych (reticulum endoplazmatyczne, rybosomy, jądro komórkowe). Z kolei w

cytoplazmie neuronów cholinergicznych dodatkowa około 3% frakcja acetylo-CoA jest zużywana do syntezy acetylocholiny. Jest to unikalna cecha komórek tego układu neuroprzekaźniczego (Ryc 1). Wydajność tych dróg zależy od dostępności tego metabolitu w mitochondriach wpływającej bezpośrednio na szybkość jego transportu do cytoplazmy. Wskazuje to, że acetylo-CoA pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy metabolicznej we wszystkich subkompartmentach neuronalnych (Szutowicz i wsp. 2014).

Pobudzenie ekscytotoksyczne jest najwcześniejszym etapem reakcji neuronów na bodźce cytotoksyczne. Wynika ono z przedłużonej depolaryzacji zakończeń neuronów glutaminianergicznych, stanowiących 50% frakcję wszystkich neuronów mózgu. Nadmiar glutaminianu w szczelinie synaptycznej pogłębia depolaryzację neuronów postsynaptycznych poprzez pobudzenie różnych klas receptorów glutaminianergicznych. Powoduje to napływ Ca i Zn do neuronów i wzrost szybkości syntezy wolnych rodników tlenowych, nitrozylowych i kwasów tłuszczowych, które hamują TCA i syntezę ATP oraz aktywują apoptozę i inne procesy kataboliczne (Ryc. 1). Odwracalne i nieodwracalne ostre uszkodzenia ekscytotoksyczne stanowią zwykle początkowy etap przewlekłych zespołów neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (AD), Parkinsona, encefalopatia pourazowa i poalkoholowa; stany padaczkowe i inne.

Charakterystycznym objawem klinicznym w AD i innych encefalopatiach są ubytki funkcji poznawczych. Wynikają one z preferencyjnego uszkodzenia neuronów cholinergicznych jąder podstawy mózgu. W badaniach pośmiertnych mózgów dotkniętych tą chorobą stwierdzono obniżenie aktywności i poziomu markerów cholinergicznych: acetylotransferazy cholinowej (ChAT), transportera choliny o wysokim powinowactwie, pęcherzykowego transportera acetylocholiny oraz autoreceptorów muskarynowych M_2 (Tuček 1993). W badaniach immunohistochemicznych zaobserwowano preferencyjny zanik ciał i zakończeń neuronów cholinergicznych, odpowiednio jądrach podkorowych i korze mózgowej. Stopień ubytków markerów cholinergicznych stwierdzany *post mortem* w korze mózgowej korelował z ciężkością demencji ocenianej przed śmiercią pacjentów z AD (Gil-Bea i wsp. 2005). Zmianom tym towarzyszyło równoczesne obniżenie tempa metabolizmu energetycznego w mózgach dotkniętych AD stwierdzane *post mortem* w korze przedklinka tej grupy chorych (Bubber i wsp. 2004).

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że przedłużona ekspozycja na Zn lub/i inne neurotoksyny powodowała spadek aktywności PDHC. Prowadziło to do obniżenia

poziomu acetylo-CoA w mitochondriach i powodowało zwiększoną śmiertelność wysoko różnicowanych komórek cholinergicznych SN56 przegrody mózgu. Komórki niezróżnicowane o niskiej ekspresji fenotypu cholinergicznego takiej wrażliwości nie wykazywały (Szutowicz i wsp. 2000). Wynikało to z ich niskiej aktywności neuroprzekaźniczej, której towarzyszyło małe zużycie acetylo-CoA do syntezy acetylocholiny (Szutowicz i wsp. 2006; Ronowska i wsp. 2007). Natomiast neurony o wysokiej ekspresji fenotypu cholinergicznego były bardziej wrażliwe na czynniki cytotoksyczne, gdyż zużywały acetylo-CoA nie tylko do produkcji energii, ale też do syntezy acetylocholiny (Szutowicz i wsp. 2000) (Ryc. 1). W procesach neurodegeneracyjnych w zależności od rodzaju encefalopatii mogą brać udział równocześnie lub kolejno różnorodne, liczne sygnały cytotoksyczne (Szutowicz i wsp. 2017; Zadori i wsp. 2018).

4.2 Cel przeprowadzonych badań

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie czy w mechanizmach wczesnego uszkodzenia neuronów cholinergicznych może brać udział inhibicja przepływu metabolicznego acetylo-CoA przez różne etapy cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz przez drogi syntezy acetylocholiny.

W tym celu zbadano:

1. ostry wpływ zwiększonej wewnątrzneuronalnej akumulacji Zn na szlaki metaboliczmu acetylo-CoA w ich mitochondriach (praca 1cyklu),
2. ostry wpływ nadmiernej akumulacji jonów Zn na zależną od acetylo-CoA ekspresję fenotypu cholinergicznego (praca 1 cyklu),
3. wpływ innych czynników uszkadzających metabolizm acetylo-CoA, w tym subklinicznej hipowitaminozy, na podprogowe sygnały neurotoksyczne (praca 3 cyklu),
4. efekt nadmiernej akumulacji Aβ w mózgach myszy na metabolizm energetyczny i syntezę acetylocholiny (praca 2 cyklu),
5. efekt działania nowosytetyzowanych związków przeciwnowotworowych na parametry metabolizmu energetycznego w neuronach cholinergicznych (praca 4 cyklu).

4.3 Opis publikacji: opis osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

1. Ronowska A, Dyś A, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Bielarczyk H, Romianowski P, Pawełczyk T, Szutowicz A. 2010, Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells. Neurochem International; 56: 143-51

Założenia pracy:

Jednym z wczesnych sygnałów cytotoksycznych są jony cynku. Wysokie stężenia tego kationu, w postaci kompleksu Zn-glutaminian znajdują się w pęcherzykach wydzielniczych glutaminianergicznych zakończeń nerwowych. Podczas depolaryzacji do szczeliny synaptycznej wydziela się zarówno glutaminian jak i Zn. Stężenie tego kationu może osiągać w niej poziom rzędu 0.30 mmol/L. W warunkach fizjologicznych Zn jest szybko wychwytywany ze szczeliny synaptycznej głównie przez przylegające do niej astrocyty oraz neurony postsynaptyczne. Neurony postsynaptyczne posiadają specyficzne transportery ZnT3 oraz receptory NMDA, AMPA i kanały wapniowe bramkowane potencjałem błonowym, które również mogą transportować cynk (Sensi i wsp. 2009). Jest to możliwe ponieważ stężenie wolnego Zn w depolaryzowanej szczelinie synaptycznej jest dużo wyższe niż w cytoplazmie neuronów gdzie ulega on związaniu przez, występujące tam w wysokich stężeniach, białka i aniony drobnocząsteczkowe (ATP, ADP) (Sensi i wsp. 2009). Głównym ligandem Zn w komórkach są z metalotioneiny (MT) – peptydy bogate w reszty histydyny, które mają wysokie powinowactwo do tego kationu. Do znacznego podwyższenia stężenia Zn w szczelinie synaptycznej może dochodzić w przypadkach przedłużonej depolaryzacji zakończeń glutaminianergicznych wywołujących stan pobudzenia ekscytotoksycznego. Z taką sytuacją mamy do czynienia w wielu patologiach ośrodkowego układu nerwowego takich jak: padaczka, urazy mechaniczne, hipoglikemia, hipoksja czy też różnego typu bloki metaboliczne (Bertoni-Freddari i wsp. 2006). Ponadto wzrost stężenia Zn w przestrzeni pozakomórkowej (PPK) powoduje przyspieszenie powstawania oligomerów amyloidu-beta i nasilenie cytotoksycznego działania tego peptydu w chorobie Alzheimera (Liu i wsp. 2019). Wszystkie te czynniki zwiększają i wydłużają czas ekspozycji zdepolaryzowanych neuronów postsynaptycznych na wysokie [Zn^{2+}]. W efekcie akumulują one zwiększone

ilości tego kationu. Wskazuje to, że zależne od Zn zmiany neurodegeneracyjne nie są wywoływane zwiększeniem całkowitej zawartości tego metalu w encefalopatycznych mózgach, lecz jego nieprawidłową redystrybucją między pre i postsynaptycznymi przedziałami neuronów. Nasze wcześniejsze badania wykazały znaczną toksyczność przewlekłej ekspozycji neuronalnych komórek cholinergicznych przegrody mózgu myszy na Zn (Ronowska i wsp. 2007). Powodowała ona przy umiarkowanej akumulacji Zn pośrednią inhibicję szeregu enzymów metabolizmu energetycznego takich jak PDHC i akonitaza. Powodowało to obniżenie syntezy acetylo-CoA w mitochondriach neuronalnych i zmniejszenie produkcji ATP (Ronowska i wsp. 2007). W efekcie wzrastała śmiertelność neuronów cholinergicznych. Obserwacje te nie uwzględniały jednak ostrej cytotoksyczności Zn, która odgrywać może istotną rolę w krótkotrwałych epizodach hiperaktywacji neuronów glutaminianergicznych podczas przejściowych stanów hiposji, hipoglikemii itp. Uzasadniało to podjęcie przeze mnie badań nad tym zagadnieniem gdyż to ostre zaburzenia homeostazy tego kationu mogą być jedną z przyczyn wczesnej inhibicji metabolizmu energetycznego w neuronach, do których może dochodzić podczas incydentów przejściowej hipoperfuzji, często zdarzających się w mózgach osób starszych.

Opis uzyskanych wyników:

W przedstawianej pracy wykazałam, że ekspozycja zdepolaryzowanych komórek SN56 na Zn powoduje szybki, zależny od stężenia, wykładniczy, wzrost akumulacji tego kationu w neuronach. Używane stężenia Zn odpowiadały przy tym warunkom *in vivo*. Zaletą tego modelu był fakt, że podczas 30 min. ekspozycji Zn powodował upośledzenie funkcji komórek, lecz nie zmieniał ich integralności strukturalnej. Świadczyło o tym utrzymanie się niezmienionej liczby komórek nawet przy wysokich stężeniach dodawanego Zn. Tak więc model ten odpowiadałby krótko-czasowym stanom ekscytotoksycznym w mózgu. Ponadto po raz pierwszy udowodniłam, że akumulacja Zn w zdepolaryzowanych neuronach powoduje równoczesny, znaczny wzrost całkowitej akumulacji Ca, przy spadku poziomu tego kationu w mitochondriach i jego wzroście w kompartmencie cytoplazmatycznym. Zjawisko to może tłumaczyć wiele zaburzeń metabolicznych takich jak wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych, aktywację apoptozy, wzrost akumulacji Ca w reticulum endoplazmatycznym jak również mechanizm cytotoksyczności samego Zn (praca 1). I tak, zakumulowany Zn hamowałby

aktywność PDHC wskutek wewnątrzmitochondrialnej hipokalcemii, spowodowanej zahamowaniem aktywności wymiennika Na-Ca, powodującej inhibicję aktywności fosfatazy PDH. Drugą przyczyną inhibicji PDHC mogło być stwierdzane przez nas wcześniej, usuwanie lipoamidu z centrum aktywnego podjednostki E2 PDHC (Ronowska i wsp. 2007). Kolejnymi czynnikami powodującymi obniżenie żywotności komórek neuronalnych przez nadmiar Zn może być bezpośrednia inhibicja szeregu enzymów odpowiedzialnych za przepływ metaboliczny acetylo-CoA w cyklu TCA. I tak okazało się, że Zn^{2+} hamował aktywności akonitazy i ICDH-NADP 10 razy silniej niż aktywność PDHC. Nie ograniczało to jednak istotnie przepływu acetylo-CoA przez te etapy TCA, gdyż Vmax dla tych enzymów była 5 razy wyższa niż aktywność PDHC. Z drugiej strony chroniczne zahamowanie ich aktywności stanowić może istotny czynnik prowadzący do spadku produkcji energii i do uszkodzenia komórek. Drugim etapem ograniczającym przepływ metaboliczny acetylo-CoA w TCA jest reakcja KDHC, której wartość Vmax jest kilka-kilkunaście razy niższa od Vmax poprzedzających etapów. Co więcej, okazało się, że w różnicowanych komórkach SN56 Ki dla Zn w stosunku do KDHC jest 8 razy niższa niż w nieróżnicowanych. Tłumaczyłoby to po części większą wrażliwość różnicowanych neuronów cholinergicznych na ten bodziec cytotoksyczny. Kolejnym czynnikiem odpowiedzialnym za znaczną wrażliwość różnicowanych cholinergicznych SN56 na Zn było większe niż w nieróżnicowanych obniżenie poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA. Powodowało to wtórne obniżenie poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie i inhibicję zależnych od niego dróg metabolicznych. Jednocześnie aktywność maksymalna ChAT-u pozostawała w tych warunkach bez zmian. Może to świadczyć o tym, że enzym ten i prawdopodobnie inne komponenty fenotypu cholinergicznego są oporne na ostre bezpośrednie lub pośrednie działanie Zn. Dlatego obserwowane obniżenie poziomu ACh oraz szybkości jej syntezy i kwantowego wydzielania mogły wynikać niemal wyłącznie ze spadku poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie komórek cholinergicznych. Tak więc poszczególne etapy metabolizmu acetylo-CoA i ACh w neuronach cholinergicznych tworzą funkcjonalną całość odpowiadającą w sposób zintegrowany na sygnały fizjologiczne i patogenne.

Wnioski:

(a) W warunkach nadmiernej depolaryzacji neuronów cholinergicznych dochodzi do zwiększenia transportu cynku do komórek, co prowadzi do obniżenia aktywności PDHC i enzymów TCA: akonitazy i ICDH.

b) Spadek aktywności PDHC prowadzi do obniżenia poziomu acetylo-CoA w mitochondriach.

c) Spadek syntezy mitochondrialnego acetylo-CoA powoduje obniżenie poziomu tego metabolitu w cytoplazmie prowadząc do spadku szybkości syntezy ACh.

d) Aktywność ChAT nie jest bezpośrednio hamowana przez Zn. Jednakże spadek poziomu acetylo-CoA w cytoplaźmie przez Zn prowadzi do spadku poziomu i wydzielania acetylocholiny.

e) Poziom acetylo-CoA w przedziale mitochondrialnym komórek cholinergicznych determinuje ich zdolność do przeżycia w warunkach cytotoksycznych.

f) Poziom acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym determinuje zdolność komórek cholinergicznych do utrzymania ich funkcji neurotransmisyjnych.

2. Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Höfling C, Ronowska A, Gul-Hinc S, Roßner S, Schliebs R, Pawelczyk T, Szutowicz A. AβPP-transgenic 2576 mice mimic cell type-specific aspects of acetyl-CoA-linked metabolic deficits in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2015; 48: 1083-94

Założenia pracy:

Amyloid-beta$_{1-42}$ (Aβ) jest uznanym i szeroko badanym patogenem związanym przyczynowo z powstaniem i rozwojem choroby Alzheimera. Świadczy o tym fakt istnienia ponad 100 000 pozycji literaturowych dotyczących tego peptydu na wyszukiwarkach naukowych. Jednakże istnieje niewiele doniesień odnoszących się do wpływu Aβ na poziom i kompartmentację acetylo-CoA w neuronach i innych komórkach mózgu. Nie ma jednak danych dokumentujących ewentualny wpływ endogennego Aβ na metabolizm acetylo-CoA i ACh w warunkach *in vivo*. Uzasadniało to podjęcie badań *in vivo* na modelu genetycznie modyfikowanych myszy z amyloidozą, spowodowaną insertem zmutowanego ludzkiego genu APP, nad dostępnością acetylo-CoA, stanowiącego jeden z dwóch substratów do syntezy ACh, w zakończeniach nerwowych.

Opis uzyskanych wyników:

W przedstawianej pracy użyto hemizygotycznych myszy Tg 2576 z insertem genu APP695 z podwójną mutacją K670N/M671L, które w wieku 14-16 miesięcy akumulowały w mózgach 0.63 µmola Aβ1-42/kg i wykazywały znaczne ubytki poznawcze. Grupę kontrolną stanowiło ich rodzeństwo bez mutacji. Zwierzęta te były hodowane w Paul Flechsig Institute for Brain Research, Medical Faculty, University of Leipzig, Lipsk, Niemcy. W toku przeprowadzonych przeze mnie badań okazało się, że w grupie zwierząt transgenicznych, aktywności PDHC, akonitazy i KDHC nie były obniżone ani w mitochondriach zakończeń neuronalnych ani w mitochondriach całego mózgu w porównaniu z mózgami zwierząt kontrolnych. Również aktywności ChAT i liazy ATP-cytrynianowej w synaptosomach obu grup były podobne. Wskazywało to, że pomimo akumulacji Aβ zarówno neurony, w tym cholinergiczne, jak i komórki glejowe w mózgach myszy Tg2576 zachowywały integralność strukturalną. Równolegle we frakcji zakończeń nerwowych myszy Tg2576 zaobserwowano 46% inhibicję zużycia pirogronianu, oraz 33% spadek poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA. Natomiast w przedziale synatoplazmatycznym wykazałam spadki poziomów acetylo-CoA i ACh oraz inhibicję wydzielania ACh odpowiednio o 23, 36 i 33%. Wskazywałoby to na istnienie zmian czynnościowych związanych z akumulacją Aβ. Może to wynikać z faktu, że Aβ zwiększa poziom Ca w przedziale cytoplazmatycznym co z kolei indukuje syntezę reaktywnych form tlenu (Steinert i wsp. 2010). Powoduje to inhibicję PDHC, co z kolei obniża poziom acetylo-CoA w mitochondriach i wtórnie w synaptoplazmie. Ponadto inhibicja zużycia pirogronianu obecna była jedynie we frakcji synaptosomalnej, a nie w mitochondriach całego mózgu pochodzących głównie z komórek glejowych. Sugeruje to istnienie preferencyjnej akumulacji lub/i oddziaływania Aβ, na neurony. Wyniki te wskazują, że pomimo znacznego obniżenia poziomu acetylo-CoA i ACh, Aβ nie uszkadzał samego mechanizmu kwantowego wydzielania ACh, ponieważ wartości współczynnika frakcyjnego wydzielania tego neuroprzekaźnika były podobne w obu grupach doświadczalnych. Z kolei wzrost zużycia pirogronianu i utrzymanie stałego poziomu acetylo-CoA w mitochondriach glejowych Tg2576, wskazywałoby na oporność glejocytów na działanie Aβ lub/i istnienie ich kompensacyjnej aktywacji w warunkach *in vivo*. O pośrednim mechanizmie inhibicyjnego działania Aβ na PDHC w zakończeniach synaptycznych świadczy również fakt, że $A\beta_{25-35}$ i $A\beta_{1-42}$ użyte w bardzo wysokich, 20 µmol/L, stężeniach nie wywierały żadnego bezpośredniego wpływu na jego aktywność w lizatach mitochodriów synaptosomalnych i całego mózgu.

Obserwacje te różnią się od wyników badań enzymologicznych *post mortem* kory chorych z AD, gdzie stwierdzano znaczne spadki aktywności PDHC, ChAT, akonitazy i ICDH-NADP. Te niezgodności mogą wynikać z faktu, że w odróżnieniu od modelu zwierzęcego w mózgach ludzi z AD może współistnieć wiele innych patologii i sygnałów neurotoksycznych, które same lub w skojarzeniu z Aβ mogły powodować znaczne uszkodzenie metabolizmu energetycznego i struktury neuronów.

Wnioski:

a) W mózgach Tg2576 transgenicznych myszy zwiększona akumulacja Aβ prowadzi do obniżenia poziomu acetylo-CoA, w mitochondriach i cytoplazmie zakończeń nerwowych, niezależnego od inhibicji aktywności PDHC.
b) Praca ta jest pierwszym doniesieniem wykazującym, że w warunkach *in vivo* wywołane Aβ niedobory acetylo-CoA i zaburzenia jego dystrybucji wewnątrzsynaptosomalnej mogą być najwcześniejszym sygnałem uruchamiającym dalsze etapy degeneracji neuronów w AD.

3. Ronowska A, Gul-Hinc S, Michno A, Bizon-Zygmańska D, Zyśk M, Bielarczyk H, Szutowicz A, Gapys B, Jankowska-Kulawy A. Aggravated effects of coexisting marginal thiamine deficits and zinc excess on SN56 neuronal cells. Nutr Neurosci. 2019 Jul 22:1-11

Założenia pracy:

Subkliniczne niedobory pirofosforanu tiaminy (TPP) są zjawiskiem stosunkowo często występującym w krajach rozwiniętych. Stanowią one istotny problem wśród ludzi w podeszłym wieku, z ograniczeniami ruchowymi, poznawczymi, z uzależnieniami od alkoholu i chorobami przewlekłymi leczonymi antymetabolitami B1 lub utrudniającymi przyjmowanie pełnowartościowej diety. Nieznaczne niedobory TPP są częstym zjawiskiem w różnych grupach ryzyka. Uważa się, że stany te mogą sprzyjać rozwojowi AD i innych typów encefalopatii..

TPP jest kofaktorem niezbędnym do utrzymania optymalnej aktywności PDHC i szybkości syntezy acetylo-CoA. Wcześniejsze badania wykazały, że komórki neuronalne SN56 hodowane w środowisku o optymalnej zawartości tiaminy wykazywały oporność na graniczne 0.10 mmol/L stężenia Zn. Za graniczne stężenie Zn przyjmuje się takie,

które odpowiada maksymalnej zdolności jego wiązania z białkami surowicy obecnej w środowisku hodowlanym. W tych warunkach żaden z parametrów metabolizmu acetylo-CoA nie ulegał zmianie (Ronowska i wsp. 2007). Takie podprogowe sygnały neurotoksyczne występują często w patologiach układu nerwowego u ludzi. Jest prawdopodobne, że jednoczesne wystąpienie kilku słabych bodźców cytotoksycznych mogłoby wzajemnie nasilać swoje działanie. Nie wiadomo jednak jakie są interakcje między stanami subklinicznej hipowitaminozy, a innymi podprogowymi sygnałami neurotoksycznymi towarzyszącymi początkowym stadiom encefalopatii. Uzasadniało to podjęcie tej tematyki badawczej na naszym komórkowym modelu encefalopatii cholinergicznej.

Opis uzyskanych wyników:

W przedstawionej pracy wykazałam, że nieznaczne, około 20%, obniżenie poziomu tego kofaktora w komórkach neuronalnych, przez ich hodowlę w środowisku o niskiej zawartości tiaminy, nie wpływało ani na ich liczbę, ani na integralność metaboliczną. Co więcej, dodanie amprolium (antagonisty transportu tiaminy) (Bettendorff i wsp. 1995), do środowiska o obniżonej zawartości tej witaminy powodowało dalszy spadek poziomu TPP, lecz nie prowadzało do istotnych zmian w parametrach enzymatycznych i metabolicznych komórek. W takich warunkach podprogowe stężenia Zn ujawniały silne działanie cytotoksyczne w wyniku jego nadmiernej akumulacji w komórkach. Wskazuje to że, prawidłowy poziom TPP w neuronach chroni je przed nadmierną akumulacją Zn. Co więcej Zn akumulowany w komórkach z niedoborem TPP powodował dalsze pogłębienie jego niedoboru zarówno w nieróżnicowanych jak i różnicowanych SN56. Dlatego w tych warunkach zaznaczało się jego inhibicyjne działanie na aktywności PDHC, KDHC, akonitazy i ICDH. W efekcie dochodziło do obniżenia poziomu mitochondrialnego i wtórnie do spadku cytoplazmatycznego acetylo-CoA. W efekcie w komórkach SN56 o wysokiej ekspresji fenotypu cholinergicznego dochodziło do obniżenia poziomu ACh pomimo niezmienionej aktywności ChAT. Oddziaływania te były dużo słabsze lub nieobecne w komórkach nieróżnicowanych. Łączne dodanie amprolium i granicznego stężenia Zn wywierało synergistyczny supresyjny wpływ na wszystkie wyżej wymienione parametry pomiarowe w różnicowanych SN56 łącznie ze spadkiem aktywności ChAT i znacznie zwiększoną śmiertelnością. Zaznaczał się również stosunkowo nieznaczny wpływ obu związków na komórki nieróżnicowane.

Wnioski:

a) Wysoko zróżnicowane neurony cholinergiczne wykazuję wyższą wrażliwość na niedobór TPP, wynikającą z obniżenia poziomu acetylo-CoA w mitochondriach. Obniżenie poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie wynikało głównie z zahamowania aktywności PDHC.
b) Zahamowanie funkcji neuroprzekaźniczych będące skutkiem obniżenia poziomu ACh w wysoko różnicowanych komórkach cholinergicznych hodowanych bez TPP, wynika głównie z niedoborów prekursora do jej syntezy – acetylo-CoA w cytoplazmie. Aktywność ChAT-u nie była zmieniona w tych warunkach.
c) Centralnym punktem w mechanizmie toksyczności Zn jest zwiększanie przez niedobory TPP wrażliwości neuronów cholinergicznych na jego ekscytotoksyczne działanie.
e) Różne podprogowe sygnały cytotoksyczne mogą wzajemnie nasilać swoje działanie prowadząc do ujawnienia procesów neurodegeneracyjnych.

4. Cichorek M, Ronowska A, Gensicka-Kowalewska M, Deptula M, Pelikant-Malecka I, Dzierzbicka K. Novel therapeutic compound acridine-retrotuftsin action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2019; 145: 165-179

Założenia pracy:

Akrydyny i ich pochodne są trójcyklicznymi związkami o licznych aktywnościach biologicznych. Stosowane są w lecznictwie jako preparaty przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwpasożytnicze, przeciwwirusowe oraz w onkologii jako chemioterapeutyki (Kukowska 2017). Ich mechanizm polega na hamowaniu aktywności topoizomeraz i telomeraz (Gunaratnam i wsp. 2007; Ferguson and Denny 1991). Ponadto charakteryzują się zdolnością do interkalacji pomiędzy komplementarne zasady w podwójnej nici DNA (Kitchen i wsp. 1985). Jednocześnie wpływają na gospodarkę kwasowo-zasadową poprzez inhibicję anhydrazy węglanowej (Kukowska 2017). Natomiast na interakcję z układem cholinergicznym wskazuje ich inhibicyjny wpływ na aktywność acetylocholinesterazy (Makhaeva i wsp. 2018). Szerokie zastosowanie akrydyn jak i możliwości syntetyzowania nowych pochodnych, mogą uzasadniać przeprowadzenie doświadczeń mających na celu sprawdzenie potencjalnego

neurotoksycznego wpływu tych związków na neurony cholinergiczne, jako wykazujących szczególną wrażliwość na różnego typu sygnały patogenne.

Opis uzyskanych wyników:

W kolejnej pracy przeprowadziłam doświadczenia, którym poddane zostały ludzkie komórki linii SHSY5Y. Uzyskane wyniki potwierdziły szczególną rolę drogi metabolicznej PDHC-akonitaza-ICDH w procesach neurotoksyczności cholinergicznej. Komórki te można różnicować cAMP/RA w kierunku fenotypu cholinergicznego. Z drugiej strony linia ta jest modelem nowotworu neuroblastoma, często występującego u dzieci. Badano wpływ pochodnych akrydyn jako leków przeciwnowotworowych. Do badań nad toksycznością wykorzystano nowo zsyntetyzowane analogi akrydyny, z których efekt cholinotoksyczny wykazywał analog 14-ART. Pochodne były syntetyzowane w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Komórki różnicowane do fenotypu cholinergicznego wykazały się znaczną o 30% większą wrażliwością na badany związek, niż komórki nieróżnicowane. W obu typach komórek dochodziło do zahamowania podziałów komórkowych. Jednakże jedynie w różnicowanych cholinergicznie SHSY5Y stwierdzono znamienne obniżenie aktywności PDHC i akonitazy oraz niewielkie obniżenie aktywności ICDH. W związku z tym można postawić tezę, że zwiększona wrażliwość ludzkich cholinergicznych klonalnych komórek SHSY5Y na bodźce cytotoksyczne zależy w głównej mierze od ich większego zapotrzebowania na acetylo-CoA zużywany przez nie do produkcji energii i syntezy ACh.

Wnioski:

a) Spadek żywotności wysoko różnicowanych komórek cholinergicznych, przewlekle traktowanych analogiem akrydyny-ART, był wywołany inhibicją aktywności PDHC i enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych: akonitazy i ICDH.
b) Niezależnie od rodzaju komórek neuronalnych, fenotyp cholinergiczny generuje ich szczególną podatność na różnorodne neurotoksyny, których docelowymi elementami są PDHC i syntetyzowany w tej reakcji acetylo-CoA.

Praca poglądowa powiązana z osiągnięciem naukowym:

5. Ronowska A, Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J, Dyś A, Zyśk M, Jankowska-Kulawy A. The Regulatory Effects of Acetyl-CoA Distribution in the Healthy and Diseased Brain. Front Cell Neurosci., 2018, 10; 12-16

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń posłużyły do napisania pracy poglądowej nad rolą acetylo-CoA w procesach neurodegeneracji.

Acetylowany CoA pochodzący z dekarboksylacji pirogronianu jest głównym substratem energetycznym dla TCA w mitochondriach mózgu. Z drugiej strony komórki neuronalne i komórki glejowe posiadają różny profil energetyczny. Dzięki temu dystrybucja acetylo-CoA pomiędzy nimi jest nie tylko unikalna dla danego typu komórek ale też dopasowana do jego potrzeb energetycznych. Stężenia acetylo-CoA na skutek działania szeregu czynników fizjologicznych i patologicznych mogą ulegać zmianom. Może to wynikać a faktu, że enzymy metabolizujące acetylo-CoA wykazują względnie niskie powinowactwo do tego substratu. Dlatego zmiany prowadzące do zaburzeń dystrybucji wewnątrzkomórkowej acetylo-CoA mogą być wczesnymi pierwotnymi sygnałami, które głęboko się modyfikują żywotność i funkcję komórek. Transport acetylo-CoA z przedziałów mitochondrialnych do przedziałów pozamitochondrialnych zależy od szybkości jego syntezy przez PDHC i pojemności systemów transportowych w błonach mitochondrialnych. W neuronach cholinergicznych, mitochondrialne poziomy acetylo-CoA są niższe niż w cytoplazmie. Z drugiej strony są one są one wyższe niż w odpowiednich przedziałach komórek niecholinergicznych. Wynika to z faktu utrzymywania syntezy acetylocholiny (ACh). Synteza i uwalnianie ACh jest bezpośrednio skorelowane z poziomami acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym neuronu. Wywołane NGF, zależne od TrkA/p75NTR różnicowanie komórek neuronalnych w kierunku cholinergicznym prowadziło do zwiększenia ich podatności na uszkodzenia. Ta zwiększona wrażliwość była spowodowana przez zmiany wewnątrzkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA. Z drugiej strony dostarczanie acetylo-CoA do przedziałów ER i jądrowych może odgrywać kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu żywotność komórek neuronalnych poprzez zmianę poziomu acetylacji reszt lizyny, białek regulatorowych. Dlatego zmiany stężenia i wewnątrzkomórkowej kompartmentalizacji acetylo-CoA mogą stanowić znacząca rolę w procesach neurodegeneracji.

Wielkość wewnątrzkomórkowej puli acetylocholiny (ACh) zależy wprost od aktywności acetylotransferazy cholinowej (ChAT) oraz stężenia jej prekursora, acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym. Przy czym dokładny mechanizm tej pierwszej zależności pozostaje nieznany. Natomiast zależność szybkości syntezy ACh od poziomu acetyl-CoA wynika z faktu, że jego Km dla ChAT jest wielokrotnie wyższa od stężenia tego substratu w cytoplazmie/synaptoplazmie neuronów cholinergicznych *in situ*. Uzyskane wyniki doświadczeń wykazały, że obniżenie stężenia acetylo-CoA w kompartmencie mitochondrialnym i cytoplazmatycznym było spowodowane przewlekłym i krótko czasowym działaniem wielu czynników toksycznych na aktywność PDHC.

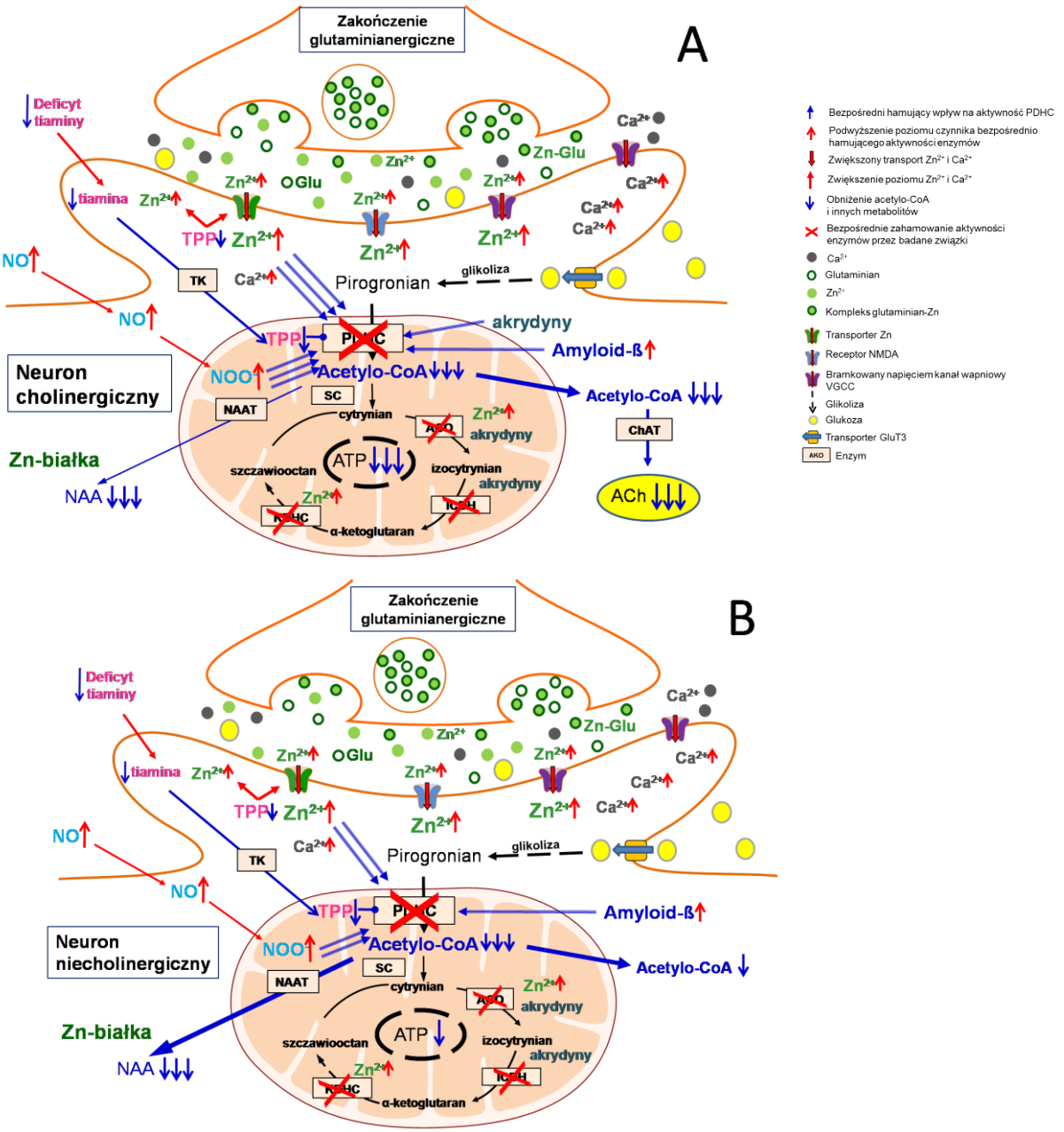
Z równania szybkości reakcji ChAT można obliczyć, że przy nasycającym stężeniu choliny i wartości Km dla acetylo-CoA 40 μM, spadek jego poziomu z 4.0 μmol/L w warunkach kontrolnych do 1.5 μmol/L w obecności 0.15 mmol/L Zn powinien hamować szybkość reakcji ChAT o 60% (z 9.1 do 3.6% szybkości maksymalnej). Z obliczeniami tymi są zgodne rzeczywiste wyniki doświadczenia, wykazujące 69% spadek szybkości syntezy ACh *in situ* w komórkach cholinergicznych w tych warunkach. Wyniki te potwierdzają tezę o kluczowej roli spadku poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA w powstawaniu wczesnych deficytów neuroprzekaźnictwa cholinergicznego w AD i prawdopodobnie innych zespołach otępiennych. Tłumaczy to mechanizm powstawania zaburzeń poznawczych we wczesnych stadiach encefalopatii cholinergicznych u ludzi i zwierząt doświadczalnych, w których zachowana jest jeszcze integralność strukturalna neuronów cholinergicznych przy już upośledzonej funkcji neuroprzekaźniczej. Z drugiej strony, można postulować, że inhibicja transportu acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy, prowadząca do zmniejszonej syntezy ACh, mogłaby mieć pewne działanie neuroprotekcyjne ponieważ pozwalałaby na zachowanie puli tego metabolitu w mitochondriach do produkcji energii pomimo zahamowania aktywności PDHC. Takie zjawisko jest obserwowane w mitochondriach nieróżnicowanych neuronów SN56, w których szybkość syntezy ACh jest niewielka. W tej grupie komórek po początkowym spadku acetylo-CoA w mitochondriach pod wpływem niskich i średnich stężeń Zn, następował jego wzrost przy wysokich stężeniach tego kationu.

W efekcie można postulować, że zaburzenia metabolizmu acetylo-CoA, wywołane szeregiem czynników neurotoksycznych, stanowią wczesne i pierwotne sygnały prowadzące do śmierci komórek.

WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z CYKLU PRAC

1. Przedstawione wyniki wskazują, że ostra, zależna od stężenia akumulacja Zn w zdepolaryzowanych neuronach postsynaptycznych, w tym cholinergicznych, może być pierwotną przyczyną zarówno inhibicji ich metabolizmu energetycznego jak i dalszych zmian neurodegeneracyjnych.
2. Zn wywiera natychmiastowe, zależne od poziomu akumulacji, wysoko – skorelowane działanie inhibicyjne na drogi metaboliczne związane z powstawaniem i zużyciem acetylo-CoA do produkcji energii i syntezy ACh. W warunkach ostrej akumulacji Zn, ekspresja fenotypu cholinergicznego (ChAT) nie ulega zmianie, a inhibicja syntezy ACh zależy wyłącznie od spadku poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA. Jest to pierwsza tego typu obserwacja w literaturze.
3. Zmiany zależne od Zn były nasilane przez graniczne niedobory TPP, które ułatwiały akumulację tego kationu w neuronach poprzez zwiększenie przepuszczalności błon plazmatycznych. Dane te wskazują, że jednocześnie występujące podprogowe sygnały neurotoksyczne mogą wzajemnie nasilać swoje działanie ujawniając procesy neurodegeneracyjne szczególnie wyraźne w komórkach o wysokiej ekspresji fenotypu cholinergicznego.
4. Akumulacja Aβ w mózgach myszy Tg2576, powodowała ubytki funkcji poznawczych lecz nie zmieniała maksymalnej aktywności kluczowych enzymów związanych z metabolizmem energetycznym i syntezą ACh. Jednakże, pośrednio hamowała zużycie pirogronianu i obniżała poziom acetylo-CoA w mitochondriach i cytoplazmie zakończeń nerwowych oraz zawartość ACh. Wskazuje to, że w warunkach *in vivo* najwcześniejszym sygnałem powodującym zaburzenia w syntezie ACh może być obniżenie poziomu acetylo-CoA w synaptoplazmie cholinergicznych zakończeń nerwowych.
5. Szczególna wrażliwość neuronalnych komórek cholinergicznych, na bodźce cytotoksyczne zależy od ich większego, niż w innych typach neuronów, zapotrzebowania na acetylo-CoA. Wynika ono ze zużycia acetylo-CoA zarówno do produkcji energii w cyklu TCA jak i do syntezy ACh w celu utrzymania funkcji neuroprzekaźniczych. Dane te wykazują po raz pierwszy, że trzy istotne sygnały cytotoksyczne jakimi są nadmierna akumulacja Aβ, Zn oraz niedobory TPP mogą wywierać synergistyczny wpływ neurotokstyczny poprzez inhibicyjne działanie na metabolizm i dystrybucję wewnątrzneuronalnego acetylo-CoA.

6. Enzymy związane z metabolizmem acetylo-CoA , a w szczególności PDHC i akonitaza mogą być miejscem docelowym cytotoksycznego działania leków przeciwnowotworowych.



Ryc.1 Enzymy metabolizmu acetylo-CoA i cytrynianu jako cel sygnałów neurotoksycznych w degeneracji neuronów cholinergicznych

Pirogronian jest końcowym produktem szlaku glikolitycznego, a jednocześnie głównym prekursorem acetylo-CoA w mitochondriach poprzez reakcję katalizowaną przez PDHC. Patogeny związane z AD i innymi encefalopatiami cholinergicznymi, takie jak: nadmierna synteza/akumulacja Aβ, epizody hipoksji/ hipoglikemi prowadzą do przedłużonej depolaryzacji i pobudzenia ekscytotoksycznego synaps glutaminianergicznych. Nadmierna depolaryzacja neuronów postsynaptycznych (w tym cholinergicznych) przez współwydzielany z glutaminianem Zn^{2+}, powoduje zwiększoną akumulację jonów cynku i wapnia stymulujących syntezę wolnych rodników tlenowych, nitrylowych i nitrozylowych. Wszystkie te sygnały cytotoksyczne bezpośrednio hamują aktywność PDHC. W efekcie dochodzi do inhibicji syntezy i obniżenia poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA, zahamowania cyklu TCA i sprzężonej z nim syntezy

ATP oraz inhibicji syntezy NAA. Dochodzi również do zmniejszenia transportu acetylo-CoA do cytoplazmy (A). W neuronach cholinergicznych większość puli cytoplazmatycznego acetylo-CoA jest zużywana do syntezy neuroprzekaźnika ACh. To dodatkowe zapotrzebowanie na reszty acetylowe powoduje, że neurony cholinergiczne są bardziej wrażliwe na sygnały neurotoksyczne niż neurony innych układów neuroprzekaźnikowych (B). Niedobór TPP uwrażliwia neurony na Zn i inne czynniki cytotoksyczne poprzez zwiększenie przepuszczalności błon plazmatycznych dla Zn i Ca i wspólne, zachodzące poprzez różne mechanizmy, inhibicyjne działanie na PDHC. Również, szereg ksenobiotyków w tym cytotsatyki cechuje duża neurotoksyczność wykorzystywana w terapii guzów mózgu. Schemat prezentuje również, różnice w zależnych od acetylo-CoA, mechanizmach neurotoksyczności cholinergicznej (A) i niecholinergicznej (B).
Skróty wg kolejności opisu mechanizmów neurotoksyczności mediowanej przez niedobory acetylo-CoA. Glu – wolny glutaminian; Glu–Zn – kompleks glutaminian-cynk; Zn^{2+} – jony cynku; Ca^{2+} – cytotoksyczne stężenia jonów Ca; Zn-białka – nietoksyczny skompleksowany Zn; NMDA – receptory N-acetylo-D-asparaginianu, ZnT – transporter cynku 3, VGCC – transporter wapniowy bramkowany potencjałem błonowym; NO – tlenek azotu syntetyzowany przez różne izoformy NOS w pobudzonym mikroleju, astrocytach i samych neuronach; TPP – pirofosforan tiaminy, kofaktor PDHC, KDHC, dehydrogenazy pirogronianowej, ketoglutaranowej; ACO-akonitaza; ICDH – dehydrogenaza izocytrynianowa-NADP; NAAT – transferaza N-acetyloasparaginianowa; NAA – N-acetyloasparaginian; ChAT – acetylotransferaza cholinowa; TK – kinaza tiaminowa

4.4 Omówienie pozostałych osiągnięć

Istnieje kilkanaście hipotez dotyczących mechanizmów powstawania i rozwoju AD. Związane są one z licznymi związkami cytotoksycznymi o różnych punktach uchwytu w komórkach neuronalnych i glejowych. Dlatego oprócz wykonywania prac badawczych bezpośrednio związanych z osiągnięciem naukowym byłam zaangażowana w badania mechanizmów działania różnych związków neurotoksycznych mających na celu sprawdzenie czy mogłyby one działać poprzez wpływ na układ PDHC-acetylo-CoA-ACh.

a) Cytotoksyczne działania związków endogennych i ksenobiotyków na komórki neuronalne i mikrolejowe

Zbadano wpływ izolowanego niedoboru TPP na przeżywalność i parametry metabolizmu acetylo-CoA komórek SN56 (A1). Amprolium po 24 godz ekspozycji wywoływało zależny od stężenia spadek zawartości TPP w badanych komórkach, wynoszący przy 5 mmol/L stężeniu inhibitora 40%, niezależnie od stopnia ich zróżnicowania. W tych warunkach obserwowano 50% spadek szybkości redukcji MTT przy nieznacznym 15% zmniejszeniu liczby komórek. Świadczy to o zahamowaniu *in situ* aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych zależnych od TPP, w tym PDHC. Aktywności ChAT w komórkach różnicowanych były około dwukrotnie wyższe niż w nieróżnicowanych. Niedobór TPP nie wpływał na aktywność ChAT w obu grupach. W tych samych warunkach dochodziło również do zahamowania aktywności PDHC. Jednocześnie

obniżały się poziomy cytoplazmatycznego acetylo-CoA w obu grupach doświadczalnych. Jednakże przy podobnym 50% obniżeniu poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie znaczący, bo ponad 40%, spadek zawartości ACh wykazano jedynie w komórkach różnicowanych. Może to wynikać z faktu, że wyjściowy poziom ACh w komórkach nieróżnicowanych był o 40% niższy niż w różnicowanych. Z tego powodu te ostatnie wykazywały mniejsze zapotrzebowanie na reszty acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym (A1). Dlatego komórki różnicowane, które zużywały więcej acetylo-CoA, wykazywały w obecności amprolium około dwukrotnie większą zdolność wydalania błękitu trypanu, niż komórki nieróżnicowane (A1). Wyniki te są zgodne z obserwacjami klinicznymi wykazującymi obecność odwracalnych ubytków poznawczych w niektórych postaciach awitaminozy B1, które we wczesnych stadiach nie powodują zmian strukturalnych w układzie cholinergicznym. Wykazują one również istnienie ścisłej zależności między stężeniem cytoplazmatycznego acetylo-CoA i wielkością puli ACh, która determinuje wielkość jej kwantowego wydzielania. Wyniki tej pracy zostały również przedstawione w pracach przeglądowych (A6).

Akumulacja metali ksenobiotycznych w mózgu takich jak glin, miedź czy ołów jest uważana za jedną z możliwych przyczyn neurodegeneracji AD. Związki wanadu są stosowane w lecznictwie ze względu na jego właściwości przeciwnowotworowe, obniżające ciśnienie krwi oraz przeciw cukrzycowe (Scibior and Zaporowska 2010). Jednakże ich potencjalna toksyczność w stosunku do neuronów cholinergiczny nie była dotąd badana. Nasze badania wykazały, że różne izoformy związków wanadu wykazywały nieco odmienne właściwości neurotoksyczne. I tak ortowanadynian powodował większą śmiertelność wysoko różnicowanych cholinergicznych komórek SN56 po krótko-czasowej, 30 minutowej ekspozycji (A2, A3). Jednakże uszkodzenie tych komórek, nie było spowodowane inhibicją aktywności PDHC i wynikającym z tego obniżeniem poziomu acetylo-CoA. Wartości tych parametrów pozostawały na poziomie kontrolnym nawet przy wysokich 0.20 mmol/L stężeniach ortowanadynianu. Stwierdzono jedynie jednakowo silne zahamowanie aktywności akonitazy w obu typach komórek (Ki poniżej 0.005 mmol/L) (A3). Inhibicja tego enzymu mogła wynikać z usuwania przez wanad jonów żelaza z jego centrów aktywnych wskutek formowania trwałych kompleksów Fe-ortowanadynian.

Z drugiej strony nie zaobserwowano różnic w śmiertelności komórek SN56 różnicowanych i nieróżnicowanych w przypadku ich ekspozycji na metawanadynianu

(A3). Również w przypadku tego związku mechanizm śmierci wynikał z izolowanej inhibicji aktywności akonitazy. Wartość stałej inhibitorowej [IC_{50}] metawanadynianu w stosunku do akonitazy *in situ* w nietkniętych komórkach wynosiła 0.03 mmol/L, a w ich lizatach 0.002 mmol/L. Wyniki te wskazują, że komórki neuronalne posiadają efektywne mechanizmy zapobiegające penetracji wanadynianów do ich wnętrza (A2, A3). Brak wpływu ekspresji fenotypu cholinergicznego na cytotoksyczność meta-i ortowanadynianów może wynikać z ich działania na dalsze etapy metabolizmu energetycznego nie obejmujące bezpośredniego wpływu na poziom acetylo-CoA.

Wiadomo, ze neurodegeneracja zależy nie tylko od bezpośredniego wpływu czynników neurotoksycznych na neurony, ale również z oddziaływania na nie różnych klas komórek glejowych, a w szczególności mikrogleju. Mikroglej jest zaliczany do komórek szybko reagujących na warunki patologiczne zwiększoną syntezą NO/rodników nitrozylowych i tlenowych oraz licznych czynników prozapalnych takich jak interleukiny 1β, 6, lub czynnik martwicy nowotworów (TNFα). Mogą one wzmacniać działanie innych badanych przez nas związków cytotoksycznych na komórki neuronalne. Uzasadniało to podjęcie badań porównawczych reakcji komórek neuronalnych i mikroglejowych na podobne sygnały cytotoksyczne.

Dlatego kolejne badania zostały przeprowadzone na równoległych hodowlach komórek mikroglejowych N9 i neuronalnych SN56 (A4). Wyniki tych prac zostały również opisane w pracach poglądowych (A6, A7). Wiadomo, że komórki mikrogleju eksponujące na swojej powierzchni receptor Toll (TRL) wykazują odpowiedź prozapalną na dodanie do hodowli bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS) (Hines i wsp., 2013). Do takich komórek zaliczamy badane przez nas komórki N9, w których stwierdzono 9-krotnie wyższą gęstość TRL niż w komórkach SN56 (A4). W efekcie w komórkach N9 zaobserwowano zależne od LPS kilkukrotne zwiększenie wydzielania NO i kilkudziesięcio-krotny wzrost wydzielania Il-6 oraz TNF-α. W tych warunkach dochodziło do inhibicji aktywności PDHC akonitazy i KDHC oraz obniżenia poziomu acetylo-CoA. Nie powodowało to jednak istotnego spadku poziomu ATP ani wzrostu śmiertelności komórek N9. Z drugiej strony cholinergiczne komórki SN56 nie reagowały nawet na wysokie stężenia LPS. Komórki SN56 wykazywały wyższe aktywności specyficzne PDHC, akonitazy, KDHC oraz wyższy poziom ATP niż komórki N9. Wynika to z ich większego zapotrzebowania na energię związanego z funkcją neuroprzekaźniczą. Również wyższe aktywności liazy ATP-cytrynianowej i acetylotransferazy karnitynowej, enzymów zaangażowanych w transport acetylo-CoA z

mitochondriów do cytoplazmy były kompatybilne z ich zużyciem do syntezy ACh. Jednakże ekspozycja tych komórek SN56 na zwiększone stężenia egzogennego NO/NOO^-, prowadziła do istotnej inhibicji aktywności enzymów metabolizmu energetycznego, w tym PDHC. Zależna od nadmiaru NO inhibicja aktywności PDHC korelowała z obniżeniem poziomu acetylo-CoA w mitochondriach i zwiększoną śmiertelnością cholinergicznych komórek SN56.

Również w komórkach N9, egzogenny NO powodował podobną względną inhibicję PDHC i innych enzymów metabolizmu energetycznego, lecz nie obniżał poziomu acetylo-CoA i nie zwiększał ich śmiertelności. Na tej podstawie przedstawiono hipotezę, że mniejsza wrażliwość mikroglejowych komórek N9 na egzogenny NO może wynikać z ich stosunkowo niewielkiego zapotrzebowania na energię. Tłumaczyłoby to również utrzymanie niezmienionego poziomu acetylo-CoA w tych warunkach. Praca ta wskazuje również, że niezależnie od rodzaju komórek dostępność acetylo-CoA odgrywa istotną rolę w utrzymaniu ich żywotności (A4, A6, A7).

Prace przeglądowe stanowią analizę prac innych autorów oraz naszych prac oryginalnych dotyczących interakcji między metabolizmem energetycznym, cholinergicznym i reszt acetylowych w różnych przedziałach komórkowych mózgu i ich roli w mechanizmach neurodegeneracji (A5, A6, A7). Wskazują one, że neurony charakteryzują się wyższym zapotrzebowaniem na glukozę z racji wyższego tempa metabolizmu energetycznego, niezbędnego do utrzymania funkcji neuroprzekaźniczych. (A5). Glukoza jest głównym źródłem acetylo-CoA pochodzącego z dekarboksylacji oksydacyjnej pirogronianu katalizowanej przez PDHC. Spośród wszystkich grup neuronów, neurony cholinergiczne wykazują się największym zużyciem acetylo-CoA, wynikającym z konieczności utrzymania stałej puli wewnatrzneuronalnej ACh koniecznej do zapewnienia odpowiedniego poziomu tego neuroprzekaźnictwa (A5). To dodatkowe zapotrzebowanie na reszty acetylowe czyni neurony cholinergiczne, bardziej niż inne komórki mózgu, wrażliwymi na działanie szeregu czynników neurotoksycznych takich jak nadmiar NO/NOO^-, Zn, Aβ, Al, wolne rodniki, hipoksja, hipoglikemię czy hipowitaminoza B1 (A6, A8). Czynniki te są wiązane z mechanizmami powstawania AD i innych chorób neurodegeneracyjnych. Jedna z prac przeglądowych podsumowuje dane dotyczące potencjalnego protekcyjnego wpływu kwasu retinowego na aktywności enzymów metabolizmu energetycznego, które zostały uprzednio zahamowane przez czynniki neurotoksyczne. Sumuje ona dane doświadczalne wskazujące, że potencjalnie skuteczne

zastosowanie retinoidów jako środków cholinotroficznych/neurotroficznych wymagałoby równoczesnej interwencji łagodzącej niedobory acetylo-CoA. Pozwoliłoby to uniknąć wtórnych uszkodzeń neuronów cholinergicznych wynikających z wywołanego przez zwiększoną neurotransmisję jednoczesnego wzrostu zapotrzebowania na acetylo-CoA do produkcji energii i ACh (A7).

Publikacje:

A1 Bizon-Zygmańska D, Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, **Ronowska A,** Marszałł M, Szutowicz A. Acetyl-CoA metabolism in amprolium-evoked thiamine pyrophosphate deficits in cholinergic SN56 neuroblastoma cells. Neurochem Int. 2011; 59: 208-16

A2 Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Aguilar LF, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, **Ronowska A,** Szutowicz A. Human erythrocytes and neuroblastoma cells are in vitro affected by sodium orthovanadate. Biochim Biophys Acta. 2012; 1818: 2260-70

A3 Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, **Ronowska A,** Zysk M, Szutowicz A. Effects of sodium metavanadate on in vitro neuroblastoma and red blood cells. Arch Biochem Biophys. 2013; 535: 248-56

A4 Klimaszewska-Łata J, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, **Ronowska A,** Zyśk M, Grużewska K, Pawełczyk T, Szutowicz A. Differential effects of lipopolysaccharide on energy metabolism in murine microglial N9 and cholinergic SN56 neuronal cells. J Neurochem. 2015; 133: 284-97

A5 Szutowicz A, Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Pawełczyk T, **Ronowska A.** Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. Neurochem Res. 2013; 38: 1523-42

A6 Szutowicz A, Bielarczyk H, **Ronowska A,** Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J, Dyś A, Zyśk M, Pawełczyk T. Intracellular redistribution of acetyl-CoA, the pivotal point in differential susceptibility of cholinergic neurons and glial cells to neurodegenerative signals. Biochem Soc Trans. 2014; 42: 1101-6

A7 Szutowicz A, Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, **Ronowska A,** Pawełczyk T. Retinoic acid as a therapeutic option in Alzheimer's disease: a focus on cholinergic restoration. Expert Rev Neurother. 2015; 15: 239-49

A8 Szutowicz A, Bielarczyk H, Zyśk M, Dyś A, **Ronowska A,** Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J. Early and late pathomechanisms in Alzheimer's Disease: from zinc to amyloid-β neurotoxicity. Neurochem Res. 2017; 42: 891-904

b) Kanały wapniowe a neurotoksyczność cynku

Nasze wcześniejsze doświadczenia wykazały, że nadmiar Zn w PPK wywołuje działanie neurotoksyczne poprzez akumulację i bezpośredni wpływ inhibicyjny na enzymy metabolizmu acetylo-CoA. Dlatego ten cykl prac dotyczy mechanizmów działania tego kationu na poziomie neuronalnych błon plazmatycznych.

Wykazano, że nadmiar Zn wywołuje zmiany płynności błon komórkowych wywołanych jego interakcją z ich komponentami fosfolipidowymi (B1) Zn wchodzi do wnętrza komórek neuronalnych poprzez bramkowane napięciem kanały wapniowe. Tłumaczyło to znaczny wzrost wykładniczy zależnej od stężenia akumulacji Zn w przedziałach cytoplazmatycznym, i mitochondrialnym zdepolaryzowanych komórek neuronalnych. Zn uławiał również akumulację Ca w przedziale cytoplazmatycznym tych komórek. Zmiany te tłumaczą inhibicję metabolizmu acetylo-CoA w tych warunkach. Rolę poszczególnych typów sterowanych potencjałem błonowym kanałów wapniowych w ostrej toksyczności Zn wyjaśniły doświadczenia z ich specyficznymi inhibitorami. I tak nifedypina, antagonista kanału L, w nasycającym stężeniu zapobiegała w około 60% uszkodzeniu neuronów poprzez 70% inhibicję akumulacji Zn, utrzymanie niezmienionego poziomu acetylo-CoA i produkcji wolnych rodników oraz częściowym protekcyjnym działaniom na aktywności ICDH i akonitazy. Inhibitory kanałów N i P/Q, odpowiednio GVIA i MVIIC, wykazywały około 20% działanie ochronne skojarzone ze znacznie słabszym wpływem na parametry metabolizmu acetylo-CoA i żywotności komórek. Dane te wskazują że bramkowane potencjałem błonowym kanały wapniowe typu L odgrywają główną rolę w ekscytotoksycznym działaniu Zn. Potwierdziły one również, że utrzymanie poziomu acetylo-CoA na optymalnym poziomie odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu cholinotoksyczności Zn (B2, A8).

Z kolei wywołane Zn obniżenie poziomu acetylo-CoA w mitochondriach prowadziło do obniżenia syntezy N-acetylo-L-asparaginianu (NAA) (B3). Jest to pochodna acetylowa tego aminokwasu, syntetyzowana wyłącznie w mitochondriach neuronów. NAA jest następnie transportowany do oligodendrocytów, gdzie jest wykorzystywany do produkcji kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów mieliny. Udowodniono, że klonalne

komórki cholinergiczne SN56 wykazują poziom tego aminokwasu zbliżony do jego poziomu w mózgu *in situ* (B2). Dzięki temu komórki SN56 mogą służyć do dalszych badań nad metabolizmem NAA. Wykazano również, że poziom NAA w wysoko różnicowanych komórkach cholinergiczne SN56 jest niższy niż w nieróżnicowanych i ulega większemu obniżeniu w obecności Zn. Wskazuje to, że proces syntezy NAA konkuruje o acetyl-CoA zarówno z TCA jak i drogą syntezy ACh (B3).

Publikacje:

B1 Suwalsky M, Novoa V, Villena F, Sotomayor CP, Aguilar LF, **Ronowska A,** Szutowicz A. Structural effects of Zn^{2+} on cell membranes and molecular models. J Inorg Biochem. 2009;103: 797-804

B2 Zyśk M, Bielarczyk H, Gul-Hinc S, Dyś A, Gapys B, **Ronowska A,** Sakowicz-Burkiewicz M, Szutowicz A. Phenotype-Dependent Interactions between N-acetyl-L-Aspartate and Acetyl-CoA in Septal SN56 Cholinergic Cells Exposed to an Excess of Zinc. J Alzheimers Dis. 2017; 56: 1145-1158

B3 Zyśk M, Gapys B, **Ronowska A,** Gul-Hinc S, Erlandsson A, Iwanicki A, Sakowicz-Burkiewicz M, Szutowicz A, Bielarczyk H. Protective effects of voltage-gated calcium channel antagonists against zinc toxicity in SN56 neuroblastoma cholinergic cells. PLoS One. 2018; 20 (12)

c) Poszukiwanie markerów molekularnych w diagnostyce nowotworowej. Badanie biologicznych właściwości pochodnych akrydyny/akrydonu w lecznictwie przeciwnowotworowym

Choroby nowotworowe są drugą po chorobach układu sercowo-naczyniowego przyczyną zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. Komórki guza nowotworowego prezentują zwykle liczne mutacje co powoduje, że są one genotypowo heterogenne. Leczenie cytostatykami często prowadzi do powstania linii opornych na leczenie. W związku z tym istnieje ciągła potrzeba poszukiwań nowych leków o właściwościach przeciw nowotworowych i o różnych mechanizmach działania. Rak jelita grubego jest drugą przyczyna zgonów nowotworowych zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Pomimo istnienia licznych schematów terapii skierowanych przeciw temu nowotworowi, część z pacjentów wykazuje oporność na leczenie. Dlatego istnieje potrzeba przeprowadzenia

charakterystyki nowotworów co prowadziłoby do personalizacji leczenia. Jednym z genów, które mogą być potencjalnym markerem raka okrężnicy, jest *CAV1*. Koduje on kaweolinę-1, białko błonowe obecne w komórkach nabłonkowych naczyń, fibroblastach, adipocytach i komórkach mięśni gładkich. Ten gen znajduje się w regionie chromosomów podatnym na delecje, dlatego można go uznać za gen supresorowy. Stwierdzono, że mutacje w genie *CAV1* występują w niektórych nowotworach. Ta mutacja czyni komórkę bardziej odporną na niedotlenienie poprzez aktywację beztlenowego metabolizmu glukozy, co sprzyja wzrostowi komórek rakowych pomimo niedoborów składników odżywczych. Dlatego zwiększona ekspresja tego genu jest związana z opornością na niektóre cytostatyki. Z drugiej strony nadekspresja tego genu sprawiła, że niedrobnokomórkowe linie komórkowe raka płuca stały się wrażliwe na leczenie metforminą. Badania przeprowadzono na 50 pacjentach cierpiących na raka jelita grubego. Wykazano obecność genu *CAV1* we wszystkich próbkach tkanek. Jednak poziom jego ekspresji był wyższy u pacjentów z większą głębokością inwazyjności guza. Dlatego uważa się, że wielkość jego ekspresji może być ważna w różnicowaniu wczesnych guzów z przerzutami z późnymi stadiami tego nowotworu (C1). Ponadto określenie ekspresji genu *CAV1* może stanowić podstawę do wyboru spersonalizowanej terapii. na ten nowotwór.

Istnieje grupa leków cytostatycznych opartych na pierścieniu akrydyny. Wykazują one właściwości hamujące aktywność telomeraz i topoizomeraz oraz interkalację w DNA. Jedną z wad tej grupy związków jest ich słaby transport do wnętrza komórek. Dlatego zsyntetyzowano pochodne akrydyn połączone z tuftsyną i retrotuftsyną pozwalające na ich lepszy transport do komórek.

Celem badań było sprawdzenie toksycznego działania różnych pochodnych akrydyny na komórki linii czerniaka melanotycznego (Ma) i niemelanotycznego (Ab) oraz komórki ludzkiego neuroblastoma SHSY5Y (C2). Badania miały charakter przesiewowy i miały na celu wybranie najlepiej działającego związku do dalszych badań nad jego toksycznością i neurotoksycznością.

Akrydyna sprzęgnięta z tuftsyną (analog 14) jako jedyny związek obniżała żywotność komórek przy wartościach [IC_{50}] 61, 96, i 48 μM odpowiednio dla: linii Ab, SHSY5Y nieróżnicowanych i SHSY5Y różnicowanych w testach żywotności XTT. Natomiast komórki Ma wykazywały wrażliwość jedynie przy wysokich stężeniach, przekraczających 0.10 mmol/L. Zaobserwowano również aktywację kaspaz jedynie w

komórkach Ab oraz zwiększoną eksternalizację fosfoseryny, co świadczyć może o indukcji procesu apapotozy (C2). Różnice w mechanizmach toksyczności w liniach Ab i SHSY5Y zostały przedstawione w oddzielnej publikacji (praca 4).

Publikacje:

C1 Kitowska A, Wesserling M, Seroczynska B, Szutowicz A, **Ronowska A,** Peksa R, Pawelczyk T. Differentiation of high-risk stage I and II colon tumors based on evaluation of CAV1 gene expression. J Surg Oncol. 2015; 112: 408-14

C2 Gensicka-Kowalewska M, Cichorek M, **Ronowska A,** Deptuła M, Klejbor I, Dzierzbicka K. Synthesis and biological evaluation of acridine/acridone analogs as potential anticancer agents. Med Chem. 2019; 15: 729-73

Bibliografia

Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation.Cell Metab. 2011; 14: 724-3

Bertoni-Freddari C, Mocchegiani E, Malavolta M, Casoli T, Di Stefano G, Fattoretti P. Synaptic and mitochondrial physiopathologic changes in the aging nervous system and the role of zinc ion homeostasis. Mech Ageing Dev. 2006; 127: 590-6

Bettendorff L, Goessens G, Sluse F, Wins P, Bureau M, Laschet J, Grisar T. Thiamine deficiency in cultured neuroblastoma cells: effect on mitochondrial function and peripheral benzodiazepine receptors. J Neurochem. 1995; 64: 2013-2

Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. Eur J Neurosci. 2006; 24: 1687-94

Ferguson LR, Denny WA. The genetic toxicology of acridines. Mutat Res. 1991; 258:123-60

Gil-Bea FJ, García-Alloza M, Domínguez J, Marcos B, Ramírez MJ. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. Neurosci Let. 2005; 375: 37-41

Gunaratnam M, Greciano O, Martins C, Reszka AP, Schultes CM, Morjani H, Riou JF, Neidle S. Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. Biochem Pharmacol. 2007; 74: 679-89

Hamberger A, Hyden H. Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. J Cell Biol. 1963; 16: 521-5

Hines DJ, Choi HB, Hines RM, Phillips AG, MacVicar BA. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. PLoS One. 2013; 8, 3

a) Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Wróblewska M, Szutowicz A. Acetyl-CoA deficit in brain mitochondria in experimental thiamine deficiency encephalopathy. Neurochem Int. 2010; 57: 851-6

b) Jankowska-Kulawy A, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Wróblewska M, Szutowicz A. Acetylo-CoA and acetylcholine metabolism in nervre terminal compartment of thiamine deficient rat brain. J. Neurochem. 2010; 115: 333-342

Kitchen SE, Wang YH, Baumstark AL, Wilson WD, Boykin DW. The intercalation of 6-chloro-substituted-9-[[3-(dimethylamino)propyl]amino]acridines with DNA. J Med Chem. 1985; 28: 940-4

Kukowska M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. Eur J Pharm Sci. 2017; 109: 587-61

Liu Y, Nguyen M, Robert A, Meunier B. Metal ions in Alzheimer's Disease: A key role or not? Acc Chem Res. 2019; 16: 2026-2035

Makhaeva GF, Kovaleva NV, Lushchekina SV, Rudakova EV, Boltneva NP, Proshin AN, Lednev BV, Serkov IV, Bachurin SO. Conjugates of tacrine and its cyclic homologues with p-toluenesulfonamide as novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. Dokl Biochem Biophys. 2018; 483 :369-373

Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiol Rev. 1997;77: 731-58

Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Bielarczyk, H., Pawełczyk, T., Szutowicz, A. Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. J Neurochem. 2007; 103, 972-83

Scibior A, Zaporowska H. Effects of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence system in rats. Environ Toxicol Pharmacol. 2010; 3: 153-6

Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. Nat Rev Neurosci. 2009; 10: 780-91

Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. Neuroscientist. 2010; 16: 435-52

Szutowicz A, Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Pawełczyk T, Ronowska A. Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. Neurochem Res. 2013; 38: 1523-4

Szutowicz A, Bielarczyk H, Ronowska A, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J, Dyś, A, Zyśk M, Pawełczyk T. Intracellular redistribution of acetyl-CoA, the pivotal point in differential susceptibility of cholinergic neurons and glial cells to neurodegenerative signals. Biochem Soc Trans. 2014; 42, 1101-6

Szutowicz A, Bielarczyk H, Zyśk M, Dyś A, Ronowska A, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J.Early and Late Pathomechanisms in Alzheimer's Disease: From Zinc to Amyloid-β Neurotoxicity. Neurochem Res. 2017; 42: 891-90

Szutowicz A, Tomaszewicz M, Jankowska A, Madziar B, Bielarczyk H. Acetyl-CoA metabolism in cholinergic neurons and their susceptibility to neurotoxic inputs. Metab Brain Dis. 2000; 15: 29-44

Tucek S. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. Prog Biophys Mol Biol. 1993; 60:59-69

Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Vécsei L. Alzheimer's Disease: Recent Concepts on the Relation of Mitochondrial Disturbances, Excitotoxicity, Neuroinflammation, and Kynurenines. J Alzheimers Dis. 2018; 62: 523-547

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W latach 2011-2019 współpracowałam z następującymi ośrodkami:

1. Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile.

W ramach tej współpracy badałam wpływ związków wanadu na cholinergiczne komórki neuronalne. W efekcie powstały następujące publikacje:

- Suwalsky M, Novoa V, Villena F, Sotomayor CP, Aguilar LF, Ronowska A, Szutowicz A. Structural effects of Zn^{2+} on cell membranes and molecular models. J Inorg Biochem. 2009;103: 797-804
- Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Aguilar LF, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, Ronowska A, Szutowicz A. Human erythrocytes and neuroblastoma cells are in vitro affected by sodium orthovanadate. Biochim Biophys Acta. 2012; 1818: 2260-70
- Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, Ronowska A, Zysk M, Szutowicz A. Effects of sodium metavanadate on in vitro neuroblastoma and red blood cells. Arch Biochem Biophys. 2013; 535: 248-56

2. Paul Flechsig Institute for Brain Research, Medical Faculty, University of Leipzig, Lipsk, Niemcy. W ramach tej współpracy odbyłam krótkoterminowy staż podoktorski. Badałam wpływ niedoborów TPP na pierwotne komórki neuronalne. Równolegle badałam zaburzenia metabolizmu acetylo-CoA w AβPP-transgenicznych myszach. W efekcie powstała następująca publikacja:

- Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Höfling C, Ronowska A, Gul-Hinc S, Roßner S, Schliebs R, Pawelczyk T, Szutowicz A. AβPP-transgenic 2576 mice mimic cell type-specific aspects of acetyl-CoA-linked metabolic deficits in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2015; 48: 1083-94

3. Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska. W ramach tej współpracy powstały następujące publikacje będące wynikiem wspólnego projektu naukowego: Synteza i badania biologiczne nowo funkcjonalizowanych pochodnych

akrydyny/akrydonu jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem czerniaka i neuroblastomy, Narodowe Centrum Nauki OPUS.

- Gensicka-Kowalewska M, Dzierzbicka K, Cichorek M, Deptuła M, Ronowska A. Synthesis new analogs of 4-methyl-1-nitroacridine and its biological evaluation as potential anticancer drugs. Asian J. Pharm. Anal. Med. Chem. 2018; 6: 2-60
- Gensicka-Kowalewska M, Cichorek M, Ronowska A, Deptuła M, Klejbor I, Dzierzbicka K. Synthesis and biological evaluation of acridine/acridone analogs as potential anticancer agents. Med Chem. 2019; 15: 729-73
- Cichorek M, Ronowska A, Gensicka-Kowalewska M, Deptula M, Pelikant-Malecka I, Dzierzbicka K. Novel therapeutic compound acridine-retrotuftsin action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. 2019, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2019; 145: 165-179

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

1. Udział w kształceniu studentów na kierunku lekarskim, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, III i V rok, od 2004-2016 roku, III rok od 2017, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych
2. Udział w kształceniu studentów na kierunku lekarskim, English Division prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, III i V rok od 2008-2016 roku, III rok od 2017, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych
3. Udział w kształceniu studentów na kierunku analityka medyczna, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok, od 2007 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych
4. Udział w kształceniu studentów na kierunku dietetyka, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok, studia stacjonarne i niestacjonarne od 2010 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych
5. Udział w kształceniu studentów na kierunku ratownictwo medyczne, prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, I i II rok od 2008-2018 roku, współautor seminariów, prezentacji multimedialnych

6. Udział w kształceniu specjalizacyjnym dla diagnostów laboratoryjnych, prowadzenie wykładów, seminariów i ćwiczeń z zaburzeń funkcji nerek, gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej, zaburzenia endokrynologiczne, od 2010 roku
7. Współautor programu nauczania diagnostyki laboratoryjnej na Wydziale Lekarskim, 2011 rok
8. Współautor skryptu „Diagnostyka Laboratoryjna" dla studentów kierunku lekarskiego, Wydziału Lekarskiego, 2018 rok
9. Nagroda Dydaktyczna Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za unowocześnienie programu nauczania diagnostyki laboratoryjnej, 2012
10. Nagroda Dydaktyczna Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za opracowanie skryptu „Diagnostyka Laboratoryjna", 2018
11. Przygotowanie i udział w Medycznym Dniu Nauki, 2018 i 2019 rok
12. Współopiekun koła naukowego, Medlab z biochemii klinicznej, 2018 rok
13. Udział w zespole konkursowym Międzynarodowego Konkursu Wiedzy Neurobiologicznej Brain Bee, 2018 i 2019 rok, członek komisji konkursowej
14. Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: Beata Joanna Gapys, Wpływ epizodów niedotlenienia na metabolizm energetyczny komórek neuronalnych, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny, 2013-2019

7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

Otrzymane nagrody i stypendia:

1. Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za badania nad neurotoksycznością cholinergiczną cynku, 2008
2. Nagroda Naukowa za Wyróżnioną Rozprawę Doktorską „Zależna od fenotypu i genotypu podatność komórek cholinergicznych na bodźce cytotoksyczne i cytoprotekcyjne", przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2009
3. Nagroda Naukowa Zespołowa I-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad zaburzeniami metabolizmu i wewnątrzkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA w encefalopatiach cholinergicznych, 2011
4. Nagroda Naukowa Zespołowa I-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad wpływem niedoboru tiaminy na metabolizm energetyczny i funkcje komórek cholinergicznych przegrody mózgu, 2012

5. Nagroda Naukowa Zespołowa III-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad cytotoksycznością i neurotoksycznością cholinergiczną wanadów, 2013
6. Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad zaburzeniami metabolizmu energetycznego jako wczesnego markera rozwoju choroby Alzheimera w różnych modelach doświadczalnych, 2016
7. Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad znaczeniem prognostycznym poziomu ekspresji genów CAV1 i TWIST1 w raku jelita grubego, 2017
8. Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia przyznana przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania patobiochemii metabolizmu energetycznego w neuronalnych liniach komórkowych hodowanych w obecności czynników toksycznych, 2019
9. Grant podróżny na uczestnictwo w ISN/ESN Summer School „Advanced Imaging and Biomarkers in Neurological Disorders", 2009, przyznany przez Paul Flechsing Institute of Brain Research Faculty of Medicine, Lipsk, Niemcy
10. Grant podróżny na uczestnictwo w 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amsterdam, Holandia, 2010, przyznany przez Forum of European Neuroscience
11. Grant podróżny na uczestnictwo w 9th International Conference on Brain Energy Metabolism, Mitochondrial-Cytosolic Interactions From Energetics to Pathogenesis, Semmelweis University, Basic Medical Science Center, Budapeszt, Węgry

8. Oświadczenie

Oświadczam, że nie ubiegałam się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Anna Remorska