

Autoreferat

Marlena Inga Zyśk

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2022

1. Imię i nazwisko.

Marlena Inga Zyśk

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

02.07.2009: Licencjat, Chemia, specjalność: chemia kosmetyków, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.

12.07.2010: Licencjat, Zarządzanie, specjalność: zarządzanie przedsiębiorstwem, Instytut Ekonomii i Zarządzania, Politechnika Koszalińska.

12.07.2011: Magister Chemii, specjalność: chemia biologiczna, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.

20.02.2013: Magister Zarządzania, specjalność: zarządzanie organizacją, Wydział Zarządzania i Ekonomii, Politechnika Gdańska.

22.09.2016: Doktor nauk medycznych, dziedzina: biologia medyczna, Gdański Uniwersytet Medyczny. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Regulacyjny wpływ białek transportujących wapń na cholinergiczne komórki mózgu oraz ich podatność na sygnały cytotoksyczne*”.

14.12.2019: Analityk medyczny, studia podyplomowe, Gdański Uniwersytet Medyczny.

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

01.10.2016 – 31.12.2016: Młodszy naukowiec w zespole Molecular Geriatrics, Laboratorium Rudbeck’a, Uniwersytet w Uppsali, Szwecja.

01.04.2017 – 30.04.2018: Asystent w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny.

01.05.2018 – 30.09.2018: Adiunkt w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny.

od 01.10.2018: Adiunkt w Zakładzie Medycyny Molekularnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Jednotematyczny cykl 3 publikacji pełnotekstowych, opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej w latach 2020 – 2021 wymienionych poniżej: (IF = 18.547; punktacja ministerstwa = 340).

Tytuł osiągnięcia:

Patofizjologia metabolizmu *N*-acetyloasparagianu w przebiegu procesów starzenia się ośrodkowego układu nerwowego

4.1. Wprowadzenie

Postęp cywilizacyjny, wraz z towarzyszącym mu rozwojem w zakresie diagnostyki oraz strategii leczniczych wpłynęły na jakość oraz długość życia człowieka. W przeszłości małoznaczący problem postępującej wraz z wiekiem degeneracji neuronów centralnego układu nerwowego stał się jednym z głównych wyzwań współczesnej nauki. Raport opublikowany w 2018 r. przez Alzheimer's Disease International szacuje, że obecnie około 50 milionów pacjentów cierpi z powodu postępujących z wiekiem chorób otępiennych, z czego miażdżącą większość stanowią pacjenci cierpiący z powodu choroby Alzheimera [1]. W związku z tym, trwają intensywne prace badawcze próbujące wyjaśnić molekularne tło procesów starzenia się centralnego układu nerwowego oraz poszukujące metod leczenia postępującej neurodegeneracji. Z badań klinicznych wynika, że neurony cholinergiczne

wykazują szczególną wrażliwość na procesy neurodegeneracyjne i w związku z tym to ich metabolizm stał się podstawowym punktem zainteresowań niniejszej pracy [2 – 3].

Neurony cholinergiczne stanowią około 1% całkowitej puli neuronów mózgu i są zlokalizowane w pniu mózgu, przodomózgowiu oraz śródmózgowiu [4 – 5]. Podstawową funkcją neuronów cholinergicznych jest przekazywanie sygnału z wykorzystaniem acetylocholinę jako neuroprzekaźnika wydzielanego do szczeliny synaptycznej [4 – 6]. Acetylocholina jest metabolitem produkowanym z acetylo-CoA i choliny w cytoplazmatycznej przestrzeni neuronów cholinergicznych [6 – 7]. Acetylo-CoA jest transportowany z mitochondrium w formie niezmiennionej, w postaci cytrynianu lub karnityny [6 – 7]. Natomiast cholina pobierana jest z otoczenia neuronów cholinergicznych za pośrednictwem transportera o wysokim powinowactwie do choliny (CHT1) [6 – 7]. Substraty reagują w obecności enzymu acetylotransferazy cholinowej (ChAT), a powstała acetylocholina jest przechowywana w pęcherzykach transportujących acetylocholinę (VACHT) [6 – 7]. W szczelinie synaptycznej, acetylocholina oddziałuje z dedykowanymi receptorami, po czym ulega rozpadowi do choliny i grup acetylowych, w obecności esterazy acetylocholinowej (AChE) [6 – 7].

Acetylo-CoA jest produktem pośrednim powstającym na drodze β -oksydacji kwasów tłuszczowych lub sprzęgania pirogronianu z koenzymem A [7 – 8]. Reakcja sprzęgania katalizowana jest przez dehydrogenazę pirogronianową, której izoforma neuronalna promuje mitochondrialny metabolizm energetyczny [7 – 8]. W warunkach fizjologicznych, neurony produkują pirogronian na drodze glikolizy bądź utleniania mleczanu [7, 9]. Glukoza transportowana jest do neuronów z wnętrza naczyń krwionośnych głównie z udziałem astrocytów, komórek glejowych uznawanych za komórki utrzymujące równowagę neuroenergetyczną w centralnym układzie nerwowym [9 – 11]. Glukoza transportowana jest do mózgu wzdłuż bariery krew-mózg tworzonej przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych oraz wspomnianych astrocytów [9 – 12]. W ostatnich latach demencja starcza nazywana jest mózgowo-specyficzną cukrzycą typu 3, przebiegającą z opornością tkanki mózgu na insulinę [19]. Odnotowano znamienne niższy poziom transportera glukozy typu 1, receptorów insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 z towarzyszącym obniżeniem poziomu astrocytarnego glikogenu [13, 20]. Ponadto, znamienne obniżeniu ulega aktywność dehydrogenazy pirogronianowej zwiększając kryzys metaboliczny, począwszy od niedoborów wspomnianego acetylo-CoA [7, 21].

W neuronach cholinergicznym, acetylo-CoA jest zużywany do kilku procesów. Przede wszystkim, około 90% tego metabolitu jest wykorzystywane do mitochondrialnego metabolizmu energetycznego [7]. Następną, kilkuprocentową pulę acetylo-CoA neurony cholinergiczne, zużywają do neuronalnej produkcji *N*-acetyloasparagianu [7]. Średnio około 3% acetylo-CoA stanowi substrat do syntezy acetylocholin -neuroprzekaźnika neuronów cholinergicznym [7]. Poniżej 1% produkowanego acetylo-CoA zużywane jest do syntezy kwasów tłuszczowych [7]. Kluczowym problemem jest nieliniowe zużycie acetylo-CoA do syntezy acetylocholin. Pobudzenie neuronów cholinergicznym znamienne zwiększa zapotrzebowanie na acetylocholinę, zużywając nawet kilka procent więcej acetylo-CoA niż w stanie spoczynkowym neuronu cholinergicznym [5, 7]. Chwilowe zwiększone zużycie acetylo-CoA może istotnie zaburzać metabolizm energetyczny, co jest prawdopodobnym powodem szczególnej wrażliwości neuronów cholinergicznym. Na ścieżce mitochondrialnego metabolizmu energetycznego, acetylo-CoA zapoczątkowuje cykl kwasów trójkarboksylowym reagując ze szczawiooctanem w obecności syntazy cytrynianowej produkując cytrynian. Mitochondrium stanowi najbardziej skomplikowane morfologicznie oraz aktywne metabolicznie organelum komórkowe [22]. Wyróżniono trzy główne grupy dysfunkcji mitochondrialnym obserwowanych podczas rozwoju neurodegeneracji: obniżony metabolizm energetyczny, narastający stres oksydacyjny oraz długofalowe zmiany w metabolizmie komórkowym [22]. Wszystkie te zjawiska oddziałują na przemiany zachodzące w cyklu kwasów trójkarboksylowym [7, 22]. Badania *post mortem* tkanki mózgowej pacjentów cierpiących z powodu choroby Alzheimera ujawniły znamienne obniżenie aktywności enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowym będących markerami stresu oksydacyjnego, tj. akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej [21]. Natomiast zwiększoną aktywność wykazywała dehydrogenaza jabłczanowa [21]. Dehydrogenaza jabłczanowa jest enzymem zaangażowanym w cykl kwasów trójkarboksylowym oraz czólenko jabłczanowo-asparagianowe. Czólenko jabłczanowo-asparagianowe pracuje na pograniczu mitochondrium i cytoplazmy, a jego główną rolą jest utrzymanie potencjału redukująco - utleniającego w mitochondrium [21, 23]. W przypadku neuronów, czólenko pełni dodatkową funkcję – jest źródłem asparagianu zużywanego do produkcji *N*-acetyloasparagianu [23].

N-acetyloasparagian jest produkowany w neuronach z acetylo-CoA oraz asparagianu w obecności *N*-acetylotransferazy asparagianowej [7, 23]. Funkcje *N*-acetyloasparagianu nie są do końca poznane, a najczęściej postulowaną jest funkcja regulatorowa oraz neuroprzekaźnicza dedykowana astrocytom i oligodendrocytom [24]. W oligodendrocytach, *N*-acetyloasparagian służy jako nośnik grup acetylowym, niezbędnych

do produkcji otoczki mielinowej układu nerwowego [23 – 25]. Natomiast na pograniczu neuronów i astrocytów, *N*-acetyloasparaginin jest najprawdopodobniej zaangażowany w metabolizm glutaminianu [24 – 25]. Poziom *N*-acetyloasparagininu (bądź wskaźnika *N*-acetyloasparaginin/kreatynina) w mózgach pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera jest średnio obniżony o 15-20% [26 – 27]. Niestety, tło molekularne tego zjawiska pozostaje nieznane.

Hipoteza robocza niniejszego cyklu publikacyjnego zakładała, że źródłem obniżenia poziomu *N*-acetyloasparagininu są zaburzenia metabolizmu energetycznego zachodzącego w rozwoju chorób otępiennych nakładające się z wyjątkową siecią połączeń metabolizmu energetycznego, neuroprzeźnaczności cholinergicznego oraz produkcji *N*-acetyloasparagininu.

4.2. Cel prowadzonych badań

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu czynników neurotoksycznych charakteryzujących procesy starzenia się centralnego układu nerwowego na metabolizm neuronów cholinergicznym. W związku z opisanymi we wstępie zmianami biochemicznymi w mózgu pacjentów cierpiących z powodu chorób neurodegeneracyjnych, szczególnym punktem moich zainteresowań była ścieżka metaboliczna łącząca produkcję *N*-acetyloasparagininu, metabolizm energetyczny oraz produkcję neuroprzeźnacznika – acetylocholiny.

W tym celu zbadano:

neuroprzeźnaczność cholinergiczną, metabolizm energetyczny oraz *N*-acetyloasparagininu w modelu:

1. *in vitro*, wtórna linia komórkowa zróżnicowana w kierunku neuronów cholinergicznym oraz poddana cytotoksycznemu działaniu jonów cynku (praca numer 1 w cyklu prac badawczych);
2. *in vivo*, dorosłe szczury płci męskiej rasy Wistar poddane iniekcji streptozotocyną (model indukowanej hiperglikemii); badania tkanki mózgu, przegrody mózgu oraz mózdzku (prace numer 1 i 2 w cyklu prac badawczych);
3. *in vitro*, szczurze embrionalne nerwowe komórki macierzyste hodowane w warunkach hiperglikemii *in vitro* (prace numer 2 w cyklu prac badawczych);

4. *in vitro*, szczurze embrionalne neurony pierwotne poddane cytotoksycznemu działaniu tlenku azotu (prace numer 2 w cyklu prac badawczych);
5. *in vivo*, dorosłe szczury płci męskiej rasy Wistar poddane wielokrotnej iniekcji teofiliną; badania tkanki mózgu, przegrody mózgu oraz mózdzku; (prace numer 1 i 3 w cyklu prac badawczych);
6. *in vitro*, szczurze embrionalne nerwowe komórki macierzyste oraz neurony pierwotne poddane czynnikom wywołującym dojrzewanie komórkowe (prace numer 3 w cyklu prac badawczych);

4.3. Opis publikacji: opis osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

1. **Zyśk M**, Sakowicz-Burkiewicz M, Pikul P, Kowalski R, Michno A, Pawełczyk T. *The impact of acetyl-CoA and aspartate shortages on the N-acetylaspartate level in different models of cholinergic neurons*. *Antioxidants*. 2020;9(6):522.

Założenia pracy:

Neurony cholinergiczne wykazują szczególną wrażliwość na niedobory energetyczne obserwowane w neuropatologiach przebiegających z pobudzeniem ekscytotoksycznym neuronów glutaminergicznych [7]. Glutaminian jest neuroprzekaźnikiem neuronów glutaminergicznych przechowywanym w postaci glutaminianu cynku wewnątrz pęcherzyków transportowych w zakończeniach nerwowych [7, 28 – 29]. Wydzielony do szczeliny synaptycznej uwalnia jony cynku, które następnie są pobierane do wnętrza komórek szczeliny synaptycznej [7, 28 – 29]. Z doniesień literaturowych wynika, że komórki modelu *in vitro* neuronów cholinergicznych (linia SN56) pobierają jony cynku z otoczenia, w stopniu prowadzącym do uszkodzenia ich mitochondrialnego metabolizmu energetycznego [28 – 29]. W poprzedniej pracy udowodniłam, że poziom *N*-acetyloasparaginy w komórkach linii SN56 jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu neuroprzekaźnika neuronów cholinergicznych (acetylocholinę) [30]. W związku z tym w niniejszej pracy oceniałam wpływ akumulacji jonów cynku na produkcję *N*-acetyloasparaginy w komórkach linii SN56 z niską bądź wysoką aktywnością acetylotransferazy cholinowej (enzym produkujący acetylocholinę). W modelu *in vivo*, dorosłe szczury rasy Wistar (płci męskiej) podzieliłam na

3 grupy: zwierzęta kontrolne, zwierzęta z hiperglikemią indukowaną iniekcją streptozotocyny oraz zwierzęta poddane 14-sto dniowej iniekcji teofiliną. Iniekcja streptozotocyny prowadzi do supresji genu *Chat* kodującego acetylotransferazę cholinową, natomiast wielokrotna iniekcja teofiliny wywołuje chroniczną stymulację neuronów cholinergiczných prowadząc do wyciszenia neuroprzeźnaczności cholinergicznego na drodze wyczerpania neuroprzeźcznika. Badaniu poddałam przegrodę mózgu wyróżniającą się wysoką aktywnością acetylotransferazy cholinowej oraz mózdzek wykazujący jedynie znikomą aktywność tego enzymu. Dodatkową zaletą badania przegrody mózgu jest zgodność obszaru mózgu, z którego wyprowadzono linię komórkowa SN56 używaną w dotychczasowych badaniach jako model *in vitro* neuronów cholinergiczných.

W pracy numer 1 skupiłam się na zależności pomiędzy aktywnością neuroprzeźczniczą neuronów cholinergiczných (syntezą acetylocholinę) a syntezą *N*-acetyloasparaginianu. Pamiętając o acetylo-CoA, jako czynnika łączącym obie syntezy, mogłam ocenić wpływ zmiennej dostępności acetylo-CoA regulowanej funkcją neuronów cholinergiczných na poziom *N*-acetyloasparaginianu.

Opis uzyskanych wyników:

Badania ścieżki syntezy *N*-acetyloasparaginianu rozpoczęłam od potwierdzenia mitochondrialnej lokalizacji tego metabolitu oraz enzymu syntetyzującego (*N*-acetylotransferazy asparaginianowej). Cytotoksyczne działanie jonów cynku ograniczyło dostępność substratów dla syntezy *N*-acetyloasparaginianu (acetylo-CoA i asparaginian), jak również poziom i aktywność *N*-acetylotransferazy asparaginianowej, co w konsekwencji obniżyło poziom *N*-acetyloasparaginianu. Aby ocenić potencjał inhibicyjny jonów cynku, aktywność enzymatyczną *N*-acetylotransferazy asparaginianowej oceniałam w lizacie komórek linii SN56 inkubowanym w środowisku modyfikowanym obecnością badanych jonów. Badania wykazały, że w odróżnieniu od jonów miedzi czy manganu, badane jony cynku blokują aktywność *N*-acetylotransferazy asparaginianowej niemal całkowicie. W kolejnym kroku porównałam wpływ jonów cynku z wpływem neuroprzeźczności cholinergicznego na poziom *N*-acetyloasparaginianu. Komórki linii SN56 inkubowałam w środowisku stymulującym neuroprzeźczność cholinergiczną, które modyfikowałam odpowiednio: mekamyliną, nifedypiną oraz 2-aminoetoksydifenylboranem. Mekamylina jest antagonistą receptorów nikotynowych wiążących acetylocholinę działającym jako czynnikiem blokującym neuroprzeźczność cholinergiczną na drodze inhibicji wiązania pomiędzy acetylocholiną a kanałami nikotynowymi. Nifedypina jest

antagonistą kanałów wapniowych bramkowanych wysokim napięciem, natomiast 2-aminoetoksydifenylboran stymuluje napływ jonów wapnia do wnętrza komórki. Obecność nifedypiny i mekamylaminy nie modyfikowała metabolizmu energetycznego oraz poziomu *N*-acetyloasparagianu. Natomiast, 2-aminoetoksydifenylboran znamienne obniżył aktywność części enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (dehydrogenazy pirogronianowej i izocytrynianej). O ile poziom acetylo-CoA pozostawał niezmienny, o tyle dysfunkcja cyklu kwasów trójkarboksylowych doprowadziła do obniżenia poziomu ATP w komórkach linii SN56. Jednocześnie 2-aminoetoksydifenylboran nie modyfikował poziomu *N*-acetyloasparagianu. Obserwacje z badań w modelu izolowanym (komórki linii SN56) odniosłam do modelu *in vivo*, w którym mogłam ocenić współzależności pomiędzy ścieżkami syntezy acetylcholiny i *N*-acetyloasparagianu w mózgu szczurów rasy Wistar.

Aktywność acetylotransferazy cholinowej w tkance przegrody mózgu i mózdzku była odwrotnie proporcjonalna do poziomu *N*-acetyloasparagianu. Iniekcja streptozotocyny bądź teofiliny powodowała znamienne obniżenie aktywności acetylotransferazy cholinowej. Hiperglikemia oraz wzrost stresu oksydacyjnego nie miały znamiennego wpływu na poziom *N*-acetyloasparagianu i mRNA genu *Nat8l* (gen kodujący enzym *N*-acetylotransferazę asparaginianową). Natomiast, aktywność *N*-acetylotransferazy asparaginianowej w przegrodzie mózgu uległa znamienne obniżeniu. Dzienna iniekcja teofiliną znamienne wpłynęła na wspomniane parametry badane zarówno w przegrodzie mózgu, jak i mózdzku. Zaobserwowane zmiany odnotowane były w tkankach o znamienne różnej aktywności cholinergiczej, co wymagało dalszych badań doświadczalnych rozgraniczających dwa podstawowe efekty iniekcji teofiliną: obniżenie aktywności neuroprzebieżnictwa cholinergicznego oraz farmakologiczny efekt teofiliny polegający na aktywacji zależnej od cyklicznego AMP kinazy białkowej A regulującej komórkową ścieżkę sygnalizacyjną.

Wnioski:

- a) inhibicyjne działanie jonów cynku wobec *N*-acetyloasparagianu związane jest z obniżeniem dostępności substratów, oraz inhibicją aktywności enzymu *N*-acetylotransferazy asparaginianowej;
- b) neuroprzebieżnictwo cholinergiczne ogranicza dostępność *N*-acetyloasparagianu w neuronach cholinergicznym;
- c) obniżenie aktywności acetylotransferazy cholinowej poprzez iniekcję streptozotocyny nie wpływa na metabolizm *N*-acetyloasparagianu;

d) teofilina obniża poziom *N*-acetyloasparagianinu na drodze niezależnej od aktywności acetylotransferazy cholinowej.

2. **Zyśk M**, Pikul P, Kowalski R, Lewandowski K, Sakowicz-Burkiewicz M, Pawełczyk T. *Neither excessive nitric oxide accumulation nor acute hyperglycemia affects the N-acetylaspartate network in Wistar rat brain cells*. Int Mol Sci. 2020;21(22):8541.

Założenia pracy:

Publikacja jest kontynuacją rozważań na temat czynników modulujących metabolizm *N*-acetyloasparagianinu. Z doniesień literaturowych wynika, że jony cynku promują wzrost stresu oksydacyjnego wewnątrz komórek linii SN56 [30]. Ponadto, coraz częściej choroba Alzheimera nazywana jest „mózgowo-specyficzną cukrzycą typu 3” i również przebiega ze wzrastającym stresem oksydacyjnym komórek mózgu. Niekontrolowana hiperglikemia może prowadzić do kryzysu energetycznego na skutek kwasicy metabolicznej oraz wzrostu poziomu markerów stresu oksydacyjnego. Z badań klinicznych wynika, że utrzymujący się stan nierównowagi metabolizmu energetycznego prowadzi do encefalopatii mózgowych i widocznego obniżenia poziomu *N*-acetyloasparagianinu w mózgu. W związku z tym, w niniejszej publikacji badałam wpływ hiperglikemii oraz akumulacji tlenu azotu na metabolizm *N*-acetyloasparagianinu. W modelu *in vivo*, badałam tkankę mózgu pochodzącą od dorosłych szczurów płci męskiej rasy Wistar, u których, analogicznie do pracy numer 1 cyklu prac badawczych, hiperglikemię wywołano jednorazową iniekcją streptozotocyny (indukowany model cukrzycy typu 1). Eksperyment kontynuowano przez 2 bądź 8 kolejnych tygodni. Metabolizm energetyczny neuronów w mózgu jest w pełni uzależniony od astrocytów. W związku z tym w modelu *in vitro*, wpływ hiperglikemii badany był z użyciem komórek linii embrionalnych szczurzych nerwowych komórek macierzystych zawierających do 80% astrocytów, do 25% neuronów i do 5% oligodendrocytów. Hodowla komórkowa odzwierciedlała metabolizm energetyczny mózgu istniejący pomiędzy astrocytami a neuronami. Hiperglikemię *in vitro* utrzymywałam przez 6 dni codziennie uzupełniając poziom glukozy. Z doniesień literaturowych wynika, że w przebiegu cukrzycy typu 1 wzrastają poziomy markerów stresu oksydacyjnego w komórkach położonych w sąsiedztwie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Proces ten jest wynikiem zwiększonej aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu. W związku z tym, neurony pierwotne kory mózgu embrionów szczurzych poddałam 24 godzinnej hodowli w obecności generatora tlenu azotu, *S*-nitrozo-*N*-acetylopenicylina. W celu oceny długofalowych skutków tlenu

azotu na neurony, kontynuowałam hodowlę pierwotną bez generatora tlenu azotu przez kolejne 3 lub 6 dni.

Opis uzyskanych wyników:

W modelu *in vivo*, hiperglikemia i kwasica metaboliczna zwiększyły poziom utlenienia błon komórkowych oraz obniżyły poziom zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Potwierdziłam obniżenie poziomu markerów neuronalnych, w szczególności neuronów cholinergicznym (acetylotransferaza cholinowa, pęcherzykowy transporter acetylocholin). Procesom tym nie towarzyszył wzrost aktywności procesów apoptotycznych (kaspaza 3, Bcl-2), co sugeruje obniżoną aktywność neuroprzekazniczą bez objawów degeneracji komórek mózgu. Zarówno w modelu *in vivo*, jak i modelach *in vitro* odnotowano znamienne obniżoną dostępność asparagianu, która nie wpływała na poziom *N*-acetyloasparagianu. W badanej tkance mózgowej nie odnotowałam wyraźnych różnic w metabolizmie energetycznym zwierząt z hiperglikemią. Hiperglikemia wraz z towarzyszącym wzrastającym stresem oksydacyjnym nie zachwiały istotnie metabolizmu *N*-acetyloasparagianu. W przypadku nerwowych komórek macierzystych (model *in vitro* badający interakcję neuronów z astrocytami i oligodendrocytami) 6 dniowa hodowla w warunkach hiperglikemii spowodowała znamienne zmiany metaboliczne uprzywilejowując glikolizę jako główną ścieżkę produkcji energii. Odwzorowanie hiperglikemii w modelu *in vitro* również wskazywało na brak wpływu badanego czynnika na metabolizm *N*-acetyloasparagianu. Alternatywnie, stres oksydacyjny wywołany akumulacją tlenu azotu w neuronach pierwotnych obniżył znamienne dostępność substratów do produkcji *N*-acetyloasparagianu, jednakże poziom samego metabolitu pozostawał niezmienny.

Wnioski:

- a) produkcja *N*-acetyloasparagianu jest niższa w neuronach cholinergicznym, a ich degeneracja nie wpływa znacząco na metabolizm *N*-acetyloasparagianu;
- b) ograniczona dostępność substratów (szczególnie asparagianu) nie jest kluczowym czynnikiem obniżającym poziom *N*-acetyloasparagianu;
- c) utrzymująca się hiperglikemia i narastający stres oksydacyjny mogą modyfikować metabolizm energetyczny, ale nie modyfikują metabolizmu *N*-acetyloasparagianu;

3. Kowalski R, Pikul P, Lewandowski K, Sakowicz-Burkiewicz M, Pawełczyk T, **Zyśk M.** *The cAMP Inducers Modify N-Acetylaspartate Metabolism in Wistar Rat Brain.* *Antioxidants.* 2021;10(9):1404.

Założenia pracy:

Poziom mRNA dla *N*-acetylotransferazy asparaginianowej wzrasta w ciągu życia ssaków. Zawartość mRNA *Nat8l* u embrionów myszy C57/BL jest najniższa i wzrasta znacząco po urodzeniu. Podawanie metamfetaminy do hodowli wtórnych linii komórkowych (PC12, SH-SY5Y) bądź myszom linii C57/BL (pomiar od 20 do 60 min po podaniu substancji) powodował znamienny wzrost poziomu *N*-acetyloasparaginianu. Działanie metamfetaminy na układ nerwowy obejmuje aktywację zależnej od cyklicznego AMP (cAMP) sygnalizacji komórkowej prowadzącej do wzmożonej fosforylacji białka CREB skutkującej wymuszeniem procesów dojrzewania komórkowego. Analogiczny efekt akumulacji obserwowaliśmy w hodowli różnicującej komórki SN56 (tj. z dodatkiem dibutyrylo-cAMP i kwasu *trans*-retinowego) czy u szczurów rasy Wistar poddanych 14-dniowej iniekcji teofiliny (praca numer 1 w cyklu publikacyjnym). Pomimo zbliżonego działania metamfetaminy do wspomnianych czynników, nasze badania wskazywały na efekt odwrotny do działania metamfetaminy. W związku z przypuszczalnym wpływem cAMP na metabolizm *N*-acetyloasparaginianu, przeprowadziłam badania akumulacji cAMP na embrionalne szczurze pierwotne komórki mózgu. Równoległe do eksperymentów *in vitro* prowadziłam badania *in vivo*, w których dorosłe szczury rasy Wistar poddałam codziennej iniekcji teofiliną przez okres 2 lub 8 tygodni.

Opis uzyskanych wyników:

W modelu *in vitro*, komórki macierzyste mózgu poddałam działaniu czynników różnicujących wywołujących dojrzewanie komórkowe aktywując różne ścieżki sygnałowe w komórkach. Porównałam również efekt 3 czynników wywołujących akumulację cAMP (tj. dibutyrylo-cAMP, teofiliny oraz forskoliny). Czynniki nie wykazywały właściwości cytotoksycznych. Wpływ dibutyrylo-cAMP i czynnika wzrostu nerwów (dojrzewanie komórkowe niezależne od cAMP) na morfologię komórek w hodowli był analogiczny. W czasie dojrzewania komórkowego neurony pierwotne znamiennie zwiększały metabolizm energetyczny oparty o dehydrogenazę pirogronianową oraz cykl kwasów trójkarboksylowych. Natomiast wysoka zawartość astrocytów (70 – 80%) w hodowli macierzystych komórek mózgu promowała szlak energetyczny oparty o produkcję mleczanu. Zarówno w modelu *in*

vivo, jak i modelach *in vitro* nie odnotowano zmian w poziomie asparagianu, która nie wpływała na poziom *N*-acetyloasparagianu.

Badanie w modelach *in vitro* pokazały, że wraz z postępem procesów różnicowania neuronów pierwotnych wywołanych cAMP bądź czynnikiem wzrostu nerwów, komórkowa lokalizacja NAT8L ulega zmianie. Ponadto, oznaczana aktywność enzymatyczna, poziom białka oraz mRNA dla *N*-acetylotransferazy asparagianowej konsekwentnie spadały. W mózgu dorosłych szczurów rasy Wistar, poziom *N*-acetyloasparagianu był znamienne niższy po 14 dniach iniekcji teofiliny, podczas gdy wydłużenie czasu iniekcji do 8 tygodni skutkowało znaminnym wzrostem poziomu tego metabolitu. Równolegle oznaczana aktywność i poziom mRNA (w odróżnieniu od aktywności) *N*-acetylotransferazy asparagianowej również spadły.

Wnioski:

- a) poziom i aktywność *N*-acetylotransferazy asparagianowej jest ściśle zależny od procesów dojrzewania komórkowego (na drodze zależnej i niezależnej od cAMP);
- b) zmiany dostępności *N*-acetyloasparagianu w komórkach mózgu są przede wszystkim konsekwencją zmian aktywności *N*-acetylotransferazy asparagianowej; jest zależna od procesów dojrzewania komórkowego;

WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z CYKLU PRAC:

- A. Wpływ jonów cynku na metabolizm *N*-acetyloasparagianu jest efektem bezpośredniej inhibicji enzymu produkującego ten metabolit, tj. *N*-acetylotransferazy asparagianowej;
- B. Metabolizm *N*-acetyloasparagianu nie jest regulowany stresem oksydacyjnym;
- C. Aktywność *N*-acetylotransferazy asparagianowej jest głównym czynnikiem regulującym metabolizm *N*-acetyloasparagianu;
- D. Poziom *N*-acetyloasparagianu pozostaje niewrażliwy na fluktuacje (na poziomie ok. 30%) dostępności substratów syntezy (tj. acetylo-CoA oraz asparagianu);
- E. Aktywność neuroprzeznaczna skutkuje obniżeniem syntezy *N*-acetyloasparagianu w neuronach cholinergicznym;

4.4. Omówienie pozostałych osiągnięć (po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych)

Zrozumienie patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych mózgu nie jest procesem jednokierunkowym i w pełni poznanym. W związku z tym, w trakcie swojej pracy naukowej zaangażowana byłam w projekty badawcze rozważające dwie obecnie badane hipotezy naukowe. Pierwszą jest postrzeganie chorób neurodegeneracyjnych jako chorób o podłożu metabolicznym związanym z zaburzeniami w transporcie glukozy i tlenu, jako głównych materiałów niezbędnych do produkcji energii. Druga hipoteza skupia swoją uwagę wokół komórek glejowych, których dysfunkcje oraz chroniczny stan pobudzenia immunologicznego zaburzają interakcje pomiędzy komórkami gleju a neuronami mózgu.

A) Wpływ jonów cynku na metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym

Metabolizm acetylo-CoA w neuronach cholinergicznym, w stosunku do neuronów nie-cholinergicznym wyróżnia się dużą liczbą ścieżek jego utylizacji. W swoich pracach nie wchodzących do cyklu osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego szczególnie naciskałam na badania metabolizmu acetylo-CoA w obecności cytotoksycznych stężeń cynku. Nadmierna wewnątrz-neuronalna akumulacja jonów cynku postulowana jest jako sprzyjająca powstawaniu megakanałów zbudowanych z amyloidu- β oraz zlokalizowanych wzdłuż błon mitochondrium komórkowego bądź retikulum endoplazmatycznego neuronów. Powstałe megakanały zaburzają wewnątrzkomórkową równowagę jonową umożliwiając niekontrolowany przepływ jonów wapnia i zaburzając ciągłość produkcji energii. Zaburzenia metabolizmu energetycznego w neuronach cholinergicznym powstałe w wyniku zwiększonej akumulacji jonów cynku niosą za sobą nieodwracalne straty energetyczne i prowadzą do neurodegeneracji. Prace numer A1, A2 i A6 są pracami podglądowymi szczegółowo omawiającymi neurotoksyczne działanie jonów cynku na podstawie zarówno wyników uzyskanych w pracach, w których współuczestniczyłam, jak i doniesienia literaturowe opublikowane przez innych naukowców.

W publikacji A3 wykazałam, że komórki linii SN56 (zarówno z niską jak i wysoką aktywnością ChAT) wykazują wysoką zdolność buforowania jonów cynku. Ponadto komórki linii SN56 z wysoką aktywnością ChAT akumulowały w swojej przestrzeni komórkowej większą ilość jonów cynku niż komórki z niską aktywnością ChAT. Jony cynku

magazynowane były w cytoplazmie, jak i mitochondrium. Przy czym poziom jonów cynku wewnątrz cytoplazmy był 5-7 razy wyższy niż w komórkach kontrolnych, a w przypadku mitochondrium różnica między komórkami hodowanymi w warunkach eksperymentalnych a kontrolnymi sięgała 60-100 krotności. Zmagazynowanie jonów cynku wewnątrz mitochondrium komórkowego zahamowało metabolizm energetyczny komórek obniżając znamienne aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oraz poziomy ATP i acetylo-CoA. Cytotoksyczny wpływ jonów cynku nie ograniczał się jedynie do metabolizmu komórkowego, ale uszkodził również ścieżkę syntezy acetylocholíny oraz zaburzył syntezę *N*-acetyloasparaginianu.

W publikacji A4 wykazałam, że depolaryzacja błony komórkowej komórek linii SN56 skutkowała znamienne wyższym poziomem jonów cynku wewnątrz komórek, niż w przypadku hodowli komórek SN56 w obecności jonów cynku w warunkach spoczynkowych przez 24 godziny. Ponadto, obecność jonów cynku w środowisku inkubacyjnym prowadziła do zwiększenia stopnia utlenienia błon komórkowych oraz zwiększała poziom formy utlenionej glutationu, potwierdzając właściwości jonów cynku promujące produkcję reaktywnych form tlenu. Obecność jonów cynku znamienne obniżała zużycie pirogronianu oraz produkcję mleczanu przez komórki linii SN56. Ponadto, aktywność dehydrogenazy pirogronianowej spadała o niemal 30%, obniżając dostępność acetylo-CoA o ponad 50%. Aktywność enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych wrażliwych na stres oksydacyjny również ulegała obniżeniu (akonitaza, dehydrogenaza izocytrynianowa). W kolejnym etapie pracy, przed dodaniem jonów cynku do środowiska hodowlanego, poddawałam komórki SN56 wstępnej inkubacji z antagonistami kanałów wapniowych: nifedypinie (antagonista kanałów typu L), konotoksyny GVIIA (antagonista kanałów typu N) oraz konotoksyny MVIIC (antagonista kanałów tylko P/Q). Pomimo znacznego ograniczenia napływu jonów cynku przez konotoksyny GVIA i MVIIC (o około 50%), poziomy badanych markerów komórkowych nie różniły się znamienne od tych oznaczonych w komórkach linii SN56 poddanych jedynie wpływowi jonów cynku. Zastosowanie nifedypiny oprócz ograniczenia napływu jonów cynku, dodatkowo ograniczyło rozwój stresu oksydacyjnego w komórkach linii SN56, co w efekcie ograniczyło cytotoksyczny wpływ jonów cynku na komórki linii SN56.

W pracy numer A5 komórki linii SN56 zostały poddane przewlekłemu niedoborowi witaminy B1, a następnie komórki hodowano w obecności cytotoksycznych stężeń jonów cynku. Zabieg ten odwzorowywał encefalopatię mózgową pacjentów przewlekle nadużywających alkoholu. U pacjentów tych obserwuje się wydłużenie czasu depolaryzacji

blony neuronów, w tym neuronów glutaminergicznych, co jak wspomniałam powyżej, prowadzi do akumulacji jonów cynku w szczelinie synaptycznej i spotęgowania neurotoksyczności jonów cynku. Ubogo składnikowa codzienna dieta prowadzi do subklinicznych niedoborów witaminy B1. Witamina B1 (tiamina) jest niezbędnym kofaktorem dehydrogenazy pirogronianowej, a niedobór tiaminy w mózgu prowadzi do nieodwracalnych zmian na skutek niewydolności metabolizmu energetycznego. Badania opublikowane w pracy A3 pokazały, że niedobór tiaminy na poziomie około 20% nie spowodował istotnych zaburzeń metabolizmu acetylo-CoA w komórkach linii SN56. Natomiast dodanie do hodowli jonów cynku drastycznie zahamowała metabolizm energetyczny komórek linii SN56 prowadząc do ich degeneracji. Dodatkowo, jony cynku, przy fizjologicznym poziomie tiaminy, wykazywały mniej cytotoksyczny wpływ na komórki SN56 niż w warunkach jej obniżonego poziomu. Analiza dotychczasowych badań wskazuje, że molekularne podłoże encefalopatii mózgowych nie jest związane z działaniem jednego czynnika cytotoksycznego, a raczej stanowi sieć wzajemnie powiązanych procesów prowadzących do kryzysu metabolicznego w komórkach mózgu i wzmożenia procesów neurodegeneracyjnych.

A1. Szutowicz A, Bielarczyk H, **Zyśk M**, Dyś A, Ronowska A, Gul-Hinc S, Klimaszewska Łata J. 2017; *Early and Late Pathomechanisms in Alzheimer's Disease: From Zinc to Amyloid-β Neurotoxicity*. *Neurochem Res.* 2017;42(3):891-904.

A2. 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;12:169.

A3. **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 Alzheimer Dis.* 2017;56(3):1145-1158.

A4. **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;13(12):e0209363.

A5. 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. 2021; 24(6):432-442.

A6. Sakowicz-Burkiewicz M, Pawełczyk T, **Zyśk M**. *Role of energy metabolism in the progression of neuroblastoma*. Int J Mol Sci. 2021; 22(21):11421.

B) Wpływ traumatycznego uszkodzenia mózgu na stan pobudzenia immunologicznego w przebiegu choroby Alzheimera oraz poszukiwanie nowych immunoterapeutyków skierowanych przeciwko agregatom amyloidu- β .

Choroba Alzheimer jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną centralnego układu nerwowego diagnozowaną u osób starszych. Patofizjologia choroby obejmuje procesy neurodegeneracyjne, obniżenie plastyczności neuronów na drodze hiperfosforylacji szkieletowego białka tau oraz obecność płytek starczych zbudowanych z agregatów hydrofobowego peptydu amyloidu- β (fragment 1-42 prekursorowego białka amyloidu- β). Rozwojowi choroby towarzyszy przewlekły stan zapalny, który stał się głównym punktem zainteresowań szeregu badaczy. Z badań wynika, że wśród osób trenujących rugby, football amerykański, czy weteranów wojennych z udokumentowanym traumatycznym uszkodzeniem mózgu w wieku młodzieńczym występuje wyższa zapadalność na choroby wieku starczego o podłożu neurodegeneracyjnym, a sam kliniczny przebieg chorób wykazuje wysoką dynamikę zmian. Uszkodzenie systemu krwionośnego mózgu jest potencjalnym zarzewiem dalszych procesów zapalnych, które tocząc się przez szereg lat aktywują komórki gleju mózgu. Rola astrocytów i mikrogleju w rozwoju neurodegeneracji nie jest do końca poznana, jednak już Alzheimer w swoich notatkach wyraźnie podkreślał obecność komórek stanu zapalnego wokół płytek starczych. Założeniem omawianego projektu była ocena długofalowego wpływu traumatycznego uszkodzenia mózgu na pobudzenie immunologiczne komórek glejowych oraz rozwój choroby Alzheimera. W projekcie, myszy transgeniczne linii ArcSwe (modelujące rodzinną postać choroby Alzheimera) poddano traumatycznemu uszkodzeniu mózgu (w schemacie uszkodzenie punktowego oraz rotacyjnego). Immunobarwienia wskazywały zauważalną różnicę w powierzchni oraz grubości zakrętu zębatego w hipokampie zwierząt, sugerującą toczący się

proces neurodegeneracji. Badania całkowitej zawartości peptydu 1-42, sumarycznego poziomu amyloidu- β 1-42 i 1-40, poziomu markera pobudzenia astrocytarnego i mikroglejowego (kwaśne białko włókienkowe, zjonizowana cząsteczka adaptorowa 1 wiążąca wapń) oraz markerów neuronalnych (synaptofazyna oraz białko związane z mikrotubulami 2) przeprowadzone w korze i hipokampie myszy transgenicznego szczepu ArcSwe potwierdzały wyraźne pogorszenie stanu zdrowia zwierząt poddanych traumatycznemu uszkodzeniu mózgu. Zdolność uczenia się i zapamiętywania była znamienne niższa u zwierząt poddanych traumatycznemu uszkodzeniu mózgu. Ponadto u zwierząt starszych, rotacyjny model uszkodzenia obniżał osiągnięcia w testach behawioralnych bardziej niż model uszkodzenia punktowego. Znamienne bardziej zaawansowany rozwój patologii amyloidu- β u zwierząt poddanych rotacyjnemu uszkodzeniu mózgu odnotowano również w badaniu metodą pozytonowej tomografii emisyjnej z radioznakowaniem [124 I]RmAb158-scFv8D3. Znacznik jest ligandem wiążącym protofibrilarnie agregaty amyloidu- β , będące toksyczną formą przejściową pomiędzy oligomerami a nierozpuszczalnymi włókienkami amyloidu- β wytrącającymi się w formie płytek starczych.

Polimeryzacja hydrofobowego peptydu amyloid- β w mózgu prowadzi do powstawania rozpuszczalnych form oligomerycznych oraz protofibrilarnych wykazujących szczególnie wysoką neurotoksyczność. BAN2401 jest przeciwciałem specyficznym wiążącym formy protofibrilarnie, testowanym w badaniach klinicznych u pacjentów cierpiących z powodu rozwoju choroby Alzheimera. Jednakże dokładny mechanizm działania przeciwciała pozostaje nieznan. Robocza hipoteza przyjęta dla niniejszej pracy tłumaczyła wysoką efektywność przeciwciała BAN2401 polegającą na tworzeniu kompleksu immunologicznego pomiędzy przeciwciałem a protofibrilami amyloidu- β . Do badań zastosowaliśmy embrionalne mysie nerwowe komórki macierzyste hodowane w obecności protofibrili amyloidu- β oraz przeciwciała mAb158, który jest myśią wersją przeciwciała BAN2401. Przeciwciała mAb158 obniżyło zawartość agregatów amyloidu- β zarówno w pożywce hodowlanej, jak i wewnątrz astrocytów. Obniżenie zawartości amyloidu- β nie zmieniało znamienne ilości astrocytów, jednakże najprawdopodobniej istotnie usprawniało działanie ścieżek proteolizy, skutkiem czego było zahamowanie procesów neurodegeneracyjnych. Należy nadmienić, że efekt ten uzyskaliśmy jedynie w momencie jednoczesnego dawkowania protofibrili amyloidu- β oraz przeciwciała mAb158, co sugeruje, że efekt terapeutyczny leku jest możliwy do osiągnięcia jedynie, gdy astrocyty pobierają toksynę i lek w formie kompleksu immunologicznego. Stosując inhibitory ścieżek lizosomalnej i proteosomalnej

wykazaliśmy, że degradacja protofibrili amyloidu- β odbywająca się wewnątrz astrocytów nie jest związana z tymi ścieżkami.

B1. **Zyśk M**, Clausen F, Aguilar X, Sehlin D, Syvänen S, Erlandsson A. *Long-term effects of traumatic brain injury in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Alzheimer Dis. 2019; 72(1): 161-180.

B2. Sölvander S, Nikitidou E, Gallasch L, **Zyśk M**, Söderberg L, Sehlin D, Lannfelt L, Erlandsson A. *The $A\beta$ protofibril selective antibody mAb158 prevents accumulation of $A\beta$ in astrocytes and rescues neurons from $A\beta$ -induced cell death*. J Neuroinflammation. 2018;15(1):98.

C) Metabolizm energetyczny płytek krwi izolowanych z krwi żyłnej pacjentów z cukrzycą typu 2.

Cukrzyca typu 2 jest przewlekłą chorobą metaboliczną charakteryzująca się opornością tkanek na insulinę. Choroba ta jest obecnie szeroko dyskutowanym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby Alzheimera. Badania podłoża demencji starczej wskazują na znamienny udział dysfunkcji metabolizmu energetycznego w rozwoju neurodegeneracji. Badania funkcji bariery krew-mózg wskazują na upośledzenie transportu glukozy do mózgu na skutek rozwijającej się oporności astrocytów na insulinę oraz insulino-podobny czynnik wzrostu 1 i 2. W niniejszej pracy zbadano metabolizm acetylo-CoA w płytkach krwi pacjentów leczonych z powodu cukrzycy typu 2. Czas trwania choroby wynosił 10 – 20 lat, a grupa badana obejmowała starszych dorosłych. Założenia pracy były zgodne z doniesieniami literaturowymi mówiącymi o neuropatiach cukrzycowych, których pierwsze objawy kliniczne pojawiają się w opisanej grupie pacjentów. Materiałem klinicznym były płytki krwi wyizolowane z krwi żyłnej, które w długoletnim przebiegu choroby postulowane są jako nadaktywne i odpowiedzialne za rozwijające się angiopatie drobnych naczyń krwionośnych. Aktywacja płytek krwi nieodłącznie związana jest z metabolizmem energetycznym samych płytek. W związku z tym badając metabolizm acetylo-CoA, mogliśmy ocenić wstępnie zmiany metaboliczne w komórkach organizmu ludzkiego wystawionego przez szereg lat na stan zmiennej glikemii. Ponadto, płytki krwi są bezpośrednio wystawione na działanie hiperglikemii we krwi oraz podobnie jak astrocyty (stan podstawowy i wzbudzenia immunologicznego) czy neurony (stan spoczynkowy i depolaryzacji), również płytki krwi

charakteryzują się stanem spoczynkowym i wzbudzonym. Warto nadmienić, że płytki krwi pochodziły od pacjentów leczonych z powodu cukrzycy typu 2, co uwzględnia wpływ zmian stanu glikemii (oraz leczenia normalizującego glikemię) na metabolizm energetyczny komórek organizmu ludzkiego. Płytki krwi wyizolowane od pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2, nie poddane aktywacji jonami wapnia, wykazywały znamienne wyższą aktywność dehydrogenazy pirogronianowej oraz istotnie podwyższone poziomy acetylo-CoA i ATP. Płytki krwi znamienne szybciej agregowały i dodatkowo miały podwyższone poziomy markerów stresu oksydacyjnego. Ekspozycja wspomnianych płytek krwi na inhibitory dehydrogenaz pirogronianowej i bursztynianowej (3-bromopirogronian oraz 3-nitropropionian) skutkowałą zmianą poziomów badanych markerów do wartości zbliżonych do tych uzyskanych dla płytek krwi izolowanych z krwi zdrowych pacjentów.

C1. Michno A, Grużewska K, Bielarczyk H, **Zyśk M**, Szutowicz A. *Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex activity by 3-bromopyruvate affects blood platelets responses in type 2 diabetes*. Pharmacol Rep. 2020;72(1):225-237.

BIBLIOGRAFIA do punktu 4 (tj. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

1. World Alzheimer's Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers. Alzheimer Disease International, London, 2018.
2. Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CC. Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. J Neurol Sci. 1982;57(2-3):407-417.
3. Muir JL. Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav. 1997;56(4):687-696.
4. Nickerson PA, Guerci A, El Mestikawy S, Semba K. Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. J Comp Neurol. 2006;498(5):690-711.
5. Richardson PJ. Quantitation of cholinergic synaptosomes from guinea pig brain. J Neurochem. 1981;37(1):258-60.

6. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(1):101–115.
7. 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;12:169.
8. Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, Sokoloff L. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(8):4879-84.
9. Mason S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Front Neurosci*. 2017;11:43.
10. Norenberg MD, Mozes LW, Gregorios JB, Norenberg LO. Effects of lactic acid on astrocytes in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1987;46(2):154-66.
11. Ranjbar M, Amiri. On the role of astrocyte analog circuit in neural frequency adaptation. *Neural Comput Appl*. 2017;28:109–1121.
12. Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain *J Neurosci Res*. 1997;49(5):617-26.
13. Fernandez AM, Hernandez-Garzón E, Perez-Domper P, Perez-Alvarez A. Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes*. 2017;66(1):64-74.
14. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(11):1766-91.
15. Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16(6):1079-89.
16. Mantioli MNPS, Nitrini R. Nitrini2 Mechanisms linking brain insulin resistance to Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol*. 2015;9(2): 96–102.
17. Fryer KL, Brown AM. Pluralistic roles for glycogen in the central and peripheral nervous systems. *Metab Brain Dis*. 2015;30(1):299-306.
18. Kolko M, Vosborg F, Henriksen UL, Hasan-Olive MM, Diget EH, Vohra R, Gurubaran IR, Gjedde A, Mariga ST, Skytt DM, Utheim TP, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Lactate Transport and Receptor Actions in Retina: Potential Roles in Retinal Function and Disease. *Neurochem Res*. 2016;41(6):1229-36.

19. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(6):1101–1113.
20. Muhič M, Vardjan N, Chowdhury HH, Zorec R, Kreft M. Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Modulate Cytoplasmic Glucose and Glycogen Levels but Not Glucose Transport across the Membrane in Astrocytes. *J Biol Chem*. 2015;290(17):11167-76.
21. Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. Mitochondria abnormalities in Alzheimer brain mechanistic implications. *Ann. Neurol*. 2005; 57(5):695-703.
22. Yan X, Hu Y, Wang B, Wang S, Zhang X. Metabolic Dysregulation Contributes to the Progression of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2020;14:530219.
23. Zyśk M, Sakowicz-Burkiewicz M, Pikul P, Kowalski R, Michno A, Pawełczyk T. The Impact of Acetyl-CoA and Aspartate Shortages on the N-Acetylaspartate Level in Different Models of Cholinergic Neurons. *Antioxidants*. 2020;9(6):522.
24. Sumi K, Uno K, Noike H, Tomohiro T, Hatanaka Y, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A. Behavioral impairment in SHATI/NAT8L knockout mice via dysfunction of myelination development. *Sci Rep*. 2017;7(1):16872.
25. Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A. Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17(8):1283-94.
26. Kantarci K, Jack CR. Neuroimaging in Alzheimer disease an evidence-based review. *Neuroimaging. Clin. N. Am*. 2003;13(2):197-209.
27. Jessen F, Lewczuk P, Gür O, Block W, Ende G, Frölich L, Hammen T, Arlt S, Kornhuber J, Kucinski T, Popp J, Peters O, Maier W, Träber F, Wiltfang J. Association of N-acetylaspartate and cerebrospinal fluid A β 42 in dementia. *J Alzheimers Dis*. 2011; 27(2):393-9.
28. Ronowska A, Dyś A, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Bielarczyk H, Romianowski P, Pawełczyk T and Szutowicz A. *Short-term effects of zinc on acetylcholine metabolism and viability of SN56 cholinergic neuroblastoma cells*. *Neurochem Int*. 2010;56:143-51.
29. Ronowska A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Pawełczyk T and Szutowicz A. *Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells*. *J Neurochem*. 2007; 103:972-983.

30. 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 Alzheimer Dis. 2017;56(3):1145-1158.

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 2011-2021 współpracowałam z następującymi ośrodkami naukowymi:

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

W ramach tej współpracy zajmowałam się hodowlą cholinergicznym komórek neuronalnych w obecności cytotoksycznych stężeń związków wanadu. W efekcie powstała następująca publikacja:

Suwalsky M, Fierro P, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K, Gul-Hinc S, Ronowska A, **Zyśk M**, Szutowicz A. *Effects of sodium metavanadate on in vitro neuroblastoma and red blood cells*. Arch Biochem Biophys. 2013;535(2):248-56.

2. Pracownia molekularnej i komórkowej nefrologii, Państwowa Akademia Nauk, Polska

W ramach współpracy zajmowałam się hodowlą nerwowych komórek macierzystych oraz neuronów pierwotnych izolowanych z mózgow embrionów szczurów rasy Wistar hodowanych w warunkach hiperglikemii *in vitro*, nadprodukcji tlenu azotu oraz zmiennych warunków dojrzewania komórkowego stymulowanego chemicznie. Ponadto izolowałam tkankę mózgu dorosłych szczurów rasy Wistar z indukowaną hiperglikemią (iniekcja streptozotocyny) lub poddawanych iniekcjom teofiliny (4 lub 8 tygodni). Uzyskany materiał poddałam analizie biochemicznej (profil metaboliczny oraz enzymatyczny badanego materiału), metodą Western Blot oraz mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej. Badania dotyczące wpływu warunków różnicujących na macierzyste komórki mózgu są obecni na

etapie przygotowywania manuskryptu do publikacji. W efekcie powstały następujące publikacje:

Zyśk M, Sakowicz-Burkiewicz M, Pikul P, Kowalski R, Michno A, Pawełczyk T. *The impact of acetyl-CoA and aspartate shortages on the N-acetylaspartate level in different models of cholinergic neurons*. *Antioxidants*. 2020;9(6):522.

Zyśk M, Pikul P, Kowalski R, Lewandowski K, Sakowicz-Burkiewicz M, Pawełczyk T. *Neither excessive nitric oxide accumulation nor acute hyperglycemia affects the N-acetylaspartate network in Wistar rat brain cells*. *Int J Mo Sci*. 2020;21(22):8541.

Kowalski R, Pikul P, Lewandowski K, Sakowicz-Burkiewicz M, Pawełczyk T, **Zyśk M**. *The cAMP Inducers Modify N-Acetylaspartate Metabolism in Wistar Rat Brain*. *Antioxidants*. 2021;10(9):1404.

3. Molecular Geriatrics, Laboratorium Rudbeck'a, Uniwersytet w Uppsali, Szwecja

Współpracując z zespołem Molecular Geriatrics prowadziłam kilka projektów, zarówno jako stażystka, jak i pracownik zespołu. W projektach skupiałam się na badaniach patomechanizmów choroby Alzheimera w komórkach gleju i neuronach. W ramach pierwszego realizowanego projektu zajmowałam się immunobarwieniem tkanek mózgu dorosłych zwierząt transgenicznych (myszy ArcSwe) poddanych traumatycznemu uszkodzeniu mózgu (badania obejmowały okres 3 lub 6 miesięcy po zabiegu chirurgicznym). Celem projektu było powiązanie chronicznego stanu zapalnym z patomechanizmami rozprzestrzeniania się amyloidu- β w chorobie Alzheimera. W kolejnych projektach badania prowadziłam z wykorzystaniem modeli *in vitro*. Mysie embrionalne nerwowe komórki macierzyste poddawałam działaniu protofibrili amyloidu- β (rozpuszczalne formy peptydu na bazie, których powstają nierozpuszczalne włókienka amyloidu- β i ostatecznie płytki starcze w mózgu), a następnie prowadziłam immunoterapię *in vitro* z wykorzystaniem przeciwciała mAb158 (praca numer B2 opisana w pozostałych osiągnięciach). Kolejne ukończone projekty pozostają na etapie przygotowania manuskryptów do publikacji. W pierwszym z nich nerwowe komórki macierzyste poddawałam hodowli w obecności protofibrili amyloidu- β , a następnie poddawałam mechanicznemu uszkodzeniu modelując traumatyczne uszkodzenie mózgu w modelu *in vitro*. W projekcie wykonałam immunobarwienia analizując poziomy

markerów charakterystycznych dla stanu pobudzenia immunologicznego astrocytów oraz autofagii. Ostatni projekt realizowałam na przełomie lat 2019-2020 w ramach uzyskanego grantu w programie im. Bekkera finansowanego ze środków Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste różnicowałam w kierunku astrocytów, a następnie poddawałam przewlekłej hodowli w obecności sonikowanych włókienek amyloidu- β . W uzyskanym materiale badałam dynamikę mitochondrialną, metabolizm energetyczny oraz aktywność peroksyosomów i lizosomów. Ponadto prowadziłam badania z zakresu patomechanizmów częściowego trawienia i rozprzestrzeniania amyloidu- β przez badane komórki. W efekcie powstały następujące publikacje:

Zyśk M, Clausen F, Aguilar X, Sehlin D, Syvänen S, Erlandsson A. *Long-term effects of traumatic brain injury in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Alzheimer Dis. 2019; 72(1): 161-180.

Söllvander S, Nikitidou E, Gallasch L, **Zyśk M**, Söderberg L, Sehlin D, Lannfelt L, Erlandsson A. *The A β protofibril selective antibody mAb158 prevents accumulation of A β in astrocytes and rescues neurons from A β -induced cell death*. J Neuroinflammation. 2018;15(1):98.

Manuskrypt 1: Gallasch L, **Zyśk M**, Beretta C, Erlandsson A. *Traumatic brain injury in the presence of A β pathology affects neuronal survival, glial activation and autophagy*. (Scientific Reports, załączono: 16/06/2021, Submission ID 3713b2e7-0207-43aa-9769-603914b23619).

Manuskrypt 2: **Zyśk M**, Beretta C, Erlandsson A. *Amyloid β disrupts mitochondria and causes changes in energy metabolism in hiPSC-derived astrocytes*.

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

1. Udział w kształceniu na kierunku lekarskim (studia stacjonarne, III i V rok studiów), prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Diagnostyki Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, od 2012.

2. Udział w kształceniu na kierunku lekarskim (studia stacjonarne, English Division, III rok studiów), prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Laboratory Diagnostic, Gdański Uniwersytet Medyczny, od 2017.
3. Udział w kształceniu na kierunku dietetyka (studia stacjonarne i niestacjonarne, II rok studiów I stopnia i I rok studiów II stopnia), prowadzenie seminariów i ćwiczeń z Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, od 2017.
4. Udział w kształceniu na kierunku analityka medyczna (studia stacjonarne, III rok studiów), prowadzenie wykładów z Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, od 2017.
5. Ronowska A, Zyśk M. Diagnostyka Laboratoryjna zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowo-magnezowej (Diagnostyka Laboratoryjna. Skrypt dla studentów); ed. H. Bielarczyk, A. Szutowicz, A. Raszeja-Specht, 2017, Gdański Uniwersytet Medyczny, pp: 367 – 389.
6. Nagroda Rektora (zespołowa, II stopnia), 2018, za opracowanie skryptu „Diagnostyka laboratoryjna”
7. Udział w kształceniu na kierunku kosmetologia (studia stacjonarne, English Division, II rok studiów), prowadzenie wykładów i ćwiczeń z Microbiology with parasitology, Wyższa Szkoła Zdrowia w Gdańsku, 2020 - 2021.
8. Udział w kształceniu na kierunku analityka medyczna (studia stacjonarne, II rok studiów), prowadzenie zajęć fakultatywnych „Moje pierwsze badania laboratoryjne – wykonam je sam, Gdański Uniwersytet Medyczny, od 2021.
9. Udział w kształceniu na kierunkach analityka medyczna , dietetyka, lekarskim, lekarsko-dentystycznym, pielęgniarstwo, ratownictwo medyczne, farmacja (studia stacjonarne, I - V rok studiów), prowadzenie interdyscyplinarnych zajęć fakultatywnych w ramach „Wielomodułowego programu poprawy efektywności i jakości funkcjonowania Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego”, Europejski Fundusz Społeczny (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020), kierownik przedmiotu fakultatywnego: Diagnostyka laboratoryjna – jak ją zrozumieć? Studium przypadków.
10. Organizacja stanowiska Zakładu Medycyny Molekularnej w ramach Dnia Nauki organizowanego przez Gdański Uniwersytet Medyczny; 2019; współorganizator.
11. Organizacja stanowiska Molecular Geriatrics w ramach SciFest organizowanego przez Urząd Miasta Uppsala i Uniwersytet w Uppsali; 2020; współorganizator.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

1. Stypendium naukowe POMOSTOWE fundowane przez Fundację Edukacji: 2006.
2. Stypendium naukowe PRYMUS fundowane przez Polsko-Amerykańską Fundację Wolności: 2007.
3. Stypendium naukowe Stowarzyszenia Krzewienia Edukacji Finansowej, Gdynia: 2008.
4. Stypendium dla najlepszych studentów niepełnosprawnych STUDENT II finansowany ze środków Polskiego Funduszu Osób Niepełnosprawnych: 2009.
5. Stypendium dla uzdolnionych niepełnosprawnych absolwentów UG (PO KL 5.0), finansowane przez Fundacja Integralia i Uniwersytet Gdański: 2011.
6. Stypendium za osiągnięcia naukowe Polsko-Amerykańskiej Fundacji Wolności: 2013.
7. Pierwsza nagroda za prezentację ustną na 21 Międzynarodowej Konferencji Studenckiej Gdańsk: 2013.
8. Stypendium dla najlepszych doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: 2014.
9. Travel Grant finansowany przez Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego: 2014.
10. Stypendium projakościowe dla doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: 2015.
11. Nagroda Rektora zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe: 2016.
12. Nagroda Rektora zespołowa II stopnia za osiągnięcia za osiągnięcia naukowe, cykl publikacyjny: 2019.
13. Stypendium im. Bekkera (Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej, ogólnopolski): 2018.
14. Nagroda Specjalna Rektora (za artykuł oryginalny – 2021; za artykuł poglądowy – 2021).
15. Członek zespołu oceniającego wnioski o finansowanie badań (Narodowy Fundusz Badawczy Ukrainy, NRFU), od 2021.

8. Oświadczenie

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

.....
(podpis wnioskodawcy)

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

1. Stypendium naukowe POMOSTOWE fundowane przez Fundację Edukacji: 2006.
2. Stypendium naukowe PRYMUS fundowane przez Polsko-Amerykańską Fundację Wolności: 2007.
3. Stypendium naukowe Stowarzyszenia Krzewienia Edukacji Finansowej, Gdynia: 2008.
4. Stypendium dla najlepszych studentów niepełnosprawnych STUDENT II finansowany ze środków Polskiego Funduszu Osób Niepełnosprawnych: 2009.
5. Stypendium dla uzdolnionych niepełnosprawnych absolwentów UG (PO KL 5.0), finansowane przez Fundacja Integralia i Uniwersytet Gdański: 2011.
6. Stypendium za osiągnięcia naukowe Polsko-Amerykańskiej Fundacji Wolności: 2013.
7. Pierwsza nagroda za prezentację ustną na 21 Międzynarodowej Konferencji Studenckiej Gdańsk: 2013.
8. Stypendium dla najlepszych doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: 2014.
9. Travel Grant finansowany przez Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego: 2014.
10. Stypendium projakościowe dla doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego: 2015.
11. Nagroda Rektora zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe: 2016.
12. Nagroda Rektora zespołowa II stopnia za osiągnięcia za osiągnięcia naukowe, cykl publikacyjny: 2019.
13. Stypendium im. Bekkera (Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej, ogólnopolski): 2018.
14. Nagroda Specjalna Rektora (za artykuł oryginalny – 2021; za artykuł pogładowy – 2021).
15. Członek zespołu oceniającego wnioski o finansowanie badań (Narodowy Fundusz Badawczy Ukrainy, NRFU), od 2021.

8. Oświadczenie

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

.....

(podpis wnioskodawcy)