Załącznik nr 3
do wniosku o przeprowadzenie postępowania
habilitacyjnego z dnia 21.03.2022 roku

Dr n. med. Grażyna Lietzau

Autoreferat

Zakład Anatomii i Neurobiologii
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2022

1. Imię i nazwisko: Grażyna Lietzau

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

1998 Tytuł magistra biologii w zakresie biologii molekularnej na podstawie pracy magisterskiej: *„Zastosowanie metody PCR-RFLP w diagnostyce ludzkich wirusów brodawczaka (HPV)"*

Rada Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii, Uniwersytet Gdański
Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna J. Podhajska

2013 Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, specjalność: neurobiologia, na podstawie rozprawy doktorskiej: „*Ocena aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB w warunkach doświadczalnego modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu u szczura*"

Rada Wydziału Lekarskiego, Gdański Uniwersytet Medyczny
Promotor: dr hab. n. med. Przemysław Kowiański
Recenzenci: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bruska,
dr hab. n. med. Walenty Nyka, prof. GUMed

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

Okres	Stanowisko	Jednostka naukowa
01-10/2005	Młodszy asystent	Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Warszawie – oddelegowana do pracy w Krajowym Ośrodku ds. Grypy w Państwowym Zakładzie Higieny, Warszawa
11/2005-01/2014	Asystent*	Zakład Anatomii i Neurobiologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny***
02/2014-nadal	Adiunkt*	Zakład Anatomii i Neurobiologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny
10/2014-12/2020 – urlop bezpłatny (w latach 2014-2015 naukowy) z GUMed		
10/2014-09/2016	Postdoctoral Researcher (2 roczne stypendia)**	Department of Clinical Science and Education, Karolinska Institutet, Södersjukhuset, Sztokholm
10/2016-11/2016	Research Assistant**	Department of Clinical Science and Education, Karolinska Institutet, Södersjukhuset, Sztokholm
12/2016-12/2020	Postdoctoral Researcher (zatrudnienie)**	Department of Clinical Science and Education, Karolinska Institutet, Södersjukhuset, Sztokholm

* Pracownik badawczo-dydaktyczny, czas przeznaczony na pracę naukową: 50%

** Pracownik naukowy, czas przeznaczony na pracę naukową: 100%

*** Do 2009 Akademia Medyczna w Gdańsku

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

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Rola cukrzycy typu 2 w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych oraz perspektywy nowego zastosowania wybranych leków przeciwcukrzycowych – podsumowanie badań doświadczalnych *in vivo*„

B) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Moje osiągnięcie naukowe stanowi cykl 4 oryginalnych, powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2016-2020 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Prace powstały po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk medycznych w 2013 roku. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Publikacje te są rezultatem mojej współpracy z grupą badawczą NeuroCardioMetabol (*https://ki.se/en/kisos/the-neurocardiometabol-group*), kierowaną przez prof. Thomasa Nyström'a i dr Cesare Patrone, działającą w Department of Clinical Science and Education w Karolinska Institutet (KI), w Sztokholmie. W trakcie mojego stażu podoktorskiego w KI (lata 2014-2020) zapoczątkowałam badania nad związkiem pomiędzy otyłością i cukrzycą typu 2 a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Na realizację części badań uzyskałam finansowanie jako kierownik projektów pod tytułem: *„Olfactory disfunction in type 2 diabetes: the first step towards cognitive decline?"* ze Stiftelser För Gamla Tjänarinnor (2019) oraz *„The effects of diabetes and obesity on the olfactory system: an important link to cognitive decline?"* z KI Stiftelser och Fonder (2019-2020). W pozostałych projektach, których opublikowane wyniki tworzą niniejszy cykl, byłam wykonawcą.

Łączna wartość bibliometryczna cyklu publikacji wynosi:

- Impact factor (IF): 20.142
- Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN): 250

W skład osiągnięcia naukowego wchodzą następujące publikacje:

1. **Lietzau G.***, Nyström T., Östenson CG., Darsalia V.*, Patrone C.* (2016) Type 2 diabetes-induced neuronal pathology in the piriform cortex of the rat is reversed by the GLP-1 receptor agonist Exendin-4. *Oncotarget,* Feb 2;7(5):5865-76; DOI: 10.18632/ oncotarget.6823

   Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na przygotowaniu materiału i wykonaniu barwień immunohistochemicznych oraz analizie stereologicznej, dokumentacji wyników i przygotowaniu rycin, istotnym wkładzie w koncepcję dyskusji i przygotowanie tekstu manuskryptu. Jako autor korespondencyjny, brałam również udział w przygotowywaniu odpowiedzi na komentarze recenzentów.

   Punktacja IF: 5,168
   Punktacja MEiN: 35

2. **Lietzau G.***, Davidsson W., Östenson CG., Chiazza F., Nathanson D., Pintana H., Skogsberg J., Klein T., Nyström T., Darsalia V.*, Patrone C.* (2018) Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity, effects partly reversed by the DPP-4

inhibitor Linagliptin. *Acta Neuropathologica Communications*, Feb 23;6(1):14; DOI: 10.1186/s40478-018-0517-1

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badania (sformułowaniu hipotez) i zaprojektowaniu doświadczeń, przeprowadzeniu testów behawioralnych, wykonaniu barwień immunohistochemicznych i analizy stereologicznej oraz nadzorze nad studentami wykonującymi badania techniką Western blot, dokumentacji wyników i przygotowaniu rycin, analizie statystycznej danych, a ponadto istotnym wkładzie w koncepcję dyskusji oraz przygotowanie tekstu manuskryptu. Jako autor korespondencyjny, przygotowałam również odpowiedzi na komentarze recenzentów i prowadziłam z nimi polemikę.

Punktacja IF: 5,883
Punktacja MEiN: 15

3. **Lietzau G.***, Nyström T., Wang Z., Darsalia V., Patrone C.* (2020) Western diet Accelerates the Impairment of Odour-related Learning and Olfactory Memory in the Mouse. *ACS Chemical Neuroscience*, Nov4;11(21):3590-3602; DOI: 10.1021/ acschemneuro.0c00466

   Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badania (sformułowaniu hipotezy) i zaprojektowaniu doświadczeń, przeprowadzeniu testów behawioralnych, przygotowaniu materiału i wykonaniu barwień immunohistochemicznych oraz analizy stereologicznej, dokumentacji wyników, stworzeniu rycin i abstraktu graficznego, istotnym wkładzie w koncepcję dyskusji oraz przygotowanie tekstu manuskryptu i jego edycję. Jako autor korespondencyjny, przygotowałam również odpowiedzi na komentarze recenzentów i prowadziłam z nimi polemikę.

   Punktacja IF: 4,418
   Punktacja MEiN: 100

4. **Lietzau G.***, Magni G., Kehr J., Yoshitake T., Candeias E., Duarte A.I., Pettersson H., Skogsberg J., Abbracchio M.P., Klein T., Nyström T., Ceruti S, Darsalia V.*, Patrone C.* (2020) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulfonylureas prevent the progressive impairment of the nigrostriatal dopaminergic system induced by diabetes during aging. *Neurobiology of Aging*; May;89:12-23; DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.01.004

   Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu barwień immunohistochemicznych i analizy stereologicznej, dokumentacji wyników i stworzeniu rycin, istotnym wkładzie w koncepcję dyskusji oraz przygotowanie tekstu manuskryptu. Jako autor korespondencyjny, brałam również udział w przygotowaniu odpowiedzi na komentarze recenzentów.

   Punktacja IF: 4,673
   Punktacja MEiN: 100

* Autor korespondencyjny

W załączeniu:
1. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (załącznik nr 4)
2. Oświadczenia pozostałych współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim (załącznik nr 5)
3. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przygotowana i poświadczona przez Bibliotekę Główną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (załącznik nr 7)

C) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WSTĘP

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia opublikowanych w 2020 roku, 422 miliony ludzi na świcie ma cukrzycę, a 1,6 miliona spośród nich umiera co roku z tego powodu [1]. Czyni to z przewlekłej choroby metabolicznej, jaką jest cukrzyca, jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. W ciągu ostatnich kilku dekad odnotowano wzrost zachorowań na cukrzycę [2], którą zalicza się do chorób cywilizacyjnych [3]. Do częstych powikłań występujących u pacjentów z cukrzycą należą choroby sercowo-naczyniowe, a wśród nich udar mózgu i zawał mięśnia sercowego, a także neuropatie, choroby nerek i oczu (m.in. retinopatia cukrzycowa) [4].

W nadchodzących latach, w związku z poprawą jakości leczenia oraz wzrostem długości życia, należy się spodziewać wzrostu częstości występowania chorób charakterystycznych dla wieku podeszłego, w tym chorób neurodegeneracyjnych. U podstaw niniejszego cyklu leży hipoteza zakładająca, że u pacjentów z cukrzycą typu 2 (ang.: type 2 diabetes mielitus [T2DM]) występuje większe ryzyko występowania zaburzeń poznawczych i motorycznych związanych z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych (odpowiednio AD i PD). W przypadku tej pierwszej grupy pacjentów wczesnym objawem będą zaburzenia węchu oraz pamięci węchowej.

Cukrzyca typu 2 a podwyższone ryzyko występowania zaburzeń funkcji poznawczych

Liczne badania wykazały, że pogorszenie funkcji poznawczych, otępienie czy chorobę Alzheimera (ang.: Alzheimer's disease, [AD]) często poprzedza występowanie zaburzeń węchowych (podsumowane w [5, 6]). Istnieją również badania kliniczne, w których u pacjentów z cukrzycą obserwowano zaburzenia funkcji węchowych w postaci podwyższonego progu detekcji zapachów [7], obniżenia zdolności do ich identyfikacji [8-10], a także zwiększonego ryzyka anosmii (całkowitej utraty węchu) [11]. Ponieważ stwierdzono również silny związek między T2DM a różnymi postaciami zaburzeń poznawczych czy otępienia (w tym także AD [12-16]), deficyty węchowe mogłyby reprezentować nie tylko wczesny objaw, ale być może również jeden z mechanizmów patogennych leżących u podstaw pogorszenia funkcji poznawczych u osób z T2DM. Wyniki kilku ostatnio przeprowadzonych badań potwierdzają tę hipotezę [17, 18]. Jednak inne badania nie wykazały deficytów węchowych u osób z T2DM [11, 19, 20]. Taki stan rzeczy może wynikać z wielu czynników, między innymi różnych kryteriów doboru uczestników badań (np. w niektórych z nich w grupie badanej znaleźli się pacjenci zarówno z cukrzycą typu 2 jak i typu 1), odmiennej metodyki badawczej (zastosowano testy węchowe o różnej czułości i specyficzności, a czasem tylko ankiety z subiektywną oceną funkcji węchowych badanego) (przegląd w: [21]), a także wpływu przyjmowanych leków przeciwcukrzycowych (wyniki badań na zwierzętach [22, 23] i jednego badania klinicznego [24] wykazały pozytywny wpływ niektórych leków przeciwcukrzycowych na układ węchowy). W związku z tym dostrzegłam konieczność bliższej charakterystyki deficytów węchowych w T2DM o różnym podłożu (genetycznym i środowiskowym np. wywołanym niezrównoważoną dietą), poznania ich związku z pogorszeniem funkcji poznawczych, a także zbadania leżących u ich podstaw mechanizmów. Co więcej, potencjalne upośledzenie funkcji poznawczych związanych z węchem (tj. pamięci węchowej) powinno być przedmiotem badań w T2DM, ponieważ wykazano iż zaburzenia tych funkcji u zwierząt i ludzi nie obciążonych cukrzycą mają związek ze starzeniem się oraz zaburzeniami funkcji poznawczych [25-30]. Tematykę tę podjęłam w moich badaniach, w których oceniałam parametry węchowe takie jak zdolność do wykrywania i odróżniania zapachów, a także pamięć węchową w dwóch modelach T2DM: genetycznym (szczury Goto-Kakizaki) oraz u myszy, u

których cukrzyca rozwinęła się w wyniku podawania jednej z dwóch rodzajów diety wywołującej otyłość: bogatej w tłuszcze (ang.: high-fat diet, [HFD]) lub tzw. diety typu zachodniego (ang.: western diet, [WD]). Wyniki badań behawioralnych dotyczących wpływu T2DM na funkcje węchowe znalazły się w publikacjach nr 2 i 3 niniejszego cyklu.

Jedną z kluczowych struktur układu węchowego jest kora gruszkowata, pierwotna kora węchowa, do której docierają projekcje komórek mitralnych i pędzelkowatych z opuszki węchowej oraz która ma liczne połączenia z innymi strukturami ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [31]. Ta istotna dla funkcjonowania układu węchowego ewolucyjnie stara kora (*paleocortex*) o budowie trójwarstwowej odgrywa kluczową rolę w percepcji zapachów [32]. Komórki nerwowe położone w tym obszarze odpowiadają za kodowanie zapachów. Neurony znajdujące się w przedniej części kory gruszkowatej kodują informacje o tożsamości chemicznej bodźca zapachowego. Zintegrowana percepcyjna reprezentacja obiektu zapachowego jest kodowana przez neurony położone w jej części tylnej [33]. Podczas gdy większość przeprowadzonych dotychczas badań skupiała się na nabłonku węchowym i opuszce węchowej [34-36], brak było danych na temat roli kory gruszkowatej w patogenezie zaburzeń węchowych w T2DM. Wyniki moich badań dotyczących wpływu T2DM na neurony w korze gruszkowatej oraz zachodzące w nich procesy są przedstawione w publikacji nr 1.

Mechanizmy neuroplastyczności, definiowanej jako zdolność do reorganizacji w obrębie sieci neuronowych w celu adaptacji do zmian środowiskowych [37], są niezwykle istotne z punktu widzenia zaburzeń węchowych w T2DM. Percepcja bodźców węchowych wymaga neuroplastyczności zarówno do wykrywania, jak i kodowania zapachów, a ważną rolę w tym procesie odgrywają GABA-ergiczne interneurony hamujące [38]. Interesujący jest fakt, że wykazano obecność zmian neurodegeneracyjnych w tej populacji interneuronów u pacjentów z AD [39]. Neuroplastyczność węchowa jest również regulowana dzięki procesowi neurogenezy w opuszce węchowej. Proces ten zachodzi w dorosłym życiu i rozpoczyna się w strefie przykomorowej ograniczającej komorę boczną. Tutaj z neuronalnych komórek macierzystych powstają niezróżnicowane i zdolne do proliferacji neuroblasty, które charakteryzuje ekspresja białka doublekortyny (DCX). Komórki te migrują do opuszki węchowej, gdzie różnicują się głównie w interneurony odgrywające istotną rolę w procesach neuroplastyczności w tej strukturze układu węchowego [40, 41]. Poprzednie badania wykazały negatywny wpływ T2DM na neuronalne komórki macierzyste w strefie przykomorowej [42, 43], jednak dotychczas brak było danych na temat tego jaki wpływ ma ta przewlekła choroba metaboliczna na neurogenezę w opuszce węchowej. Inną formę neuroplastyczności w układzie węchowym reprezentują niedojrzałe neurony kory gruszkowatej [44]. Pomimo, że ich charakterystyczną cechą jest również ekspresja białka DCX, komórki te powstały jeszcze w trakcie rozwoju zarodkowego, są post-mitotyczne i nie posiadają zdolności do proliferacji. Pula tych komórek maleje z wiekiem, z uwagi na ciągłe różnicowanie w dojrzałe neurony w odpowiedzi na nowe bodźce węchowe [45]. Wpływ T2DM na te komórki jak dotąd był nieznany. Wyniki badań dotyczących wpływu cukrzycy na mechanizmy neuroplastyczności w układzie węchowym w dwóch modelach T2DM: genetycznym oraz wywołanym niezrównoważoną dietą przedstawiono w publikacjach 1-3 cyklu.

Wiadomo, że istnieje silny związek pomiędzy upośledzeniem funkcji węchowych a występowaniem zaburzeń poznawczych [17]. Co więcej, Zhang i wsp. wykazali, że T2DM może wywoływać wczesne zmiany w układzie węchowym, które poprzedzają zaburzenia funkcji poznawczych [46]. Dane te sugerują, iż deficyty węchowe u osób z T2DM mogą być wczesnym

wskaźnikiem pogorszenia funkcji poznawczych. Jednak do tej pory nieznane były czynniki związane z T2DM, które mogą mieć na to wpływ. Otyłość jest jednym z głównych czynników ryzyka T2DM, ale to czy otyłość jest czynnikiem mającym wpływ na parametry węchowe u cukrzyków nie zostało wyjaśnione. Kwestia ta wymaga uwagi, gdyż 85% pacjentów z T2DM jest otyła [47]. Co więcej, nie wiadomo czy i jak różne czynniki prowadzące do otyłości, jak na przykład różne składniki diety czy przyrost masy ciała *per se*, wpływają na określone funkcje węchowe. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań, zarówno klinicznych jak i doświadczalnych, dotyczących wpływu otyłości na funkcje węchowe są sprzeczne. Część z nich wykazała występowanie deficytów węchowych [34, 35, 48-50], natomiast inne donoszą o zwiększonej wrażliwości na określone zapachy w zastosowanych modelach otyłości/cukrzycy [51, 52]. Należy jednak podkreślić, że w większości tych badań ocena funkcji węchowych była przeprowadzona tylko raz, dlatego też nie badano związku dynamiki czasowej tych zaburzeń w odniesieniu do rozwoju T2DM. W większości nieznane były również mechanizmy leżące u podstaw tych procesów. Wpływ T2DM, wywołanej w warunkach doświadczalnych dwoma rodzajami diety: HFD i WD, na funkcje węchowe oraz wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za deficyty węchowe były przedmiotem badań, których wyniki przedstawiono w publikacji nr 3.

Związek pomiędzy cukrzycą typu 2 a chorobą Parkinsona

Wyniki licznych badań sugerują, że T2DM bierze udział w patogenezie zaburzeń układu ruchowego, w tym choroby Parkinsona (ang.: Parkinson's desease, [PD]) [53-56]. Ponadto wykazano, że występowanie cukrzycy u osób z tą chorobą neurodegeneracyjną ma związek z obecnością jej bardziej agresywnego fenotypu [57]. Odkryto także bliską wzajemną zależność pomiędzy działaniem układu nigrostriatalnego (ang.: nigrostriatal system, [NS]), będącego częścią układu dopaminergicznego, a utrzymaniem homeostazy metabolicznej u ludzi [58]. Należy jednak podkreślić, że istnieją również doniesienia, które podważają związek pomiędzy T2DM a PD [59, 60]. Dlatego też zagadnienie to wymaga wyjaśnienia w toku dalszych badań.

Mechanizmy patofizjologiczne leżące u podstaw zwiększonego ryzyka występowania PD u pacjentów z T2DM są w większości nieznane. Mogą one być związane z zaburzeniami funkcji mitochondriów, upośledzeniem szlaków sygnalizacyjnych insuliny, a także tzw. zapaleniem metabolicznym (ang.: metabolic inflammation) (przegląd w: [61]). W warunkach doświadczalnych wykazano, że hiperglikemia wywołana u szczurów, którym jednorazowo wstrzyknięto streptozotocynę (model cukrzycy typu 1) powoduje zmiany degeneracyjne w układzie nigrostriatalnym [62]. Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych koncentrowały się na wpływie otyłości i T2DM na układ dopaminergiczny. Wykazały one, że insulinooporność i stan przedcukrzycowy wywołane u dorosłych szczurów w wieku 16-tygodni, które karmiono dietą bogatą w tłuszcze (HFD) przez zaledwie 3 miesiące, ograniczają uwalnianie i usuwanie dopaminy ze szczeliny synaptycznej [63] oraz redukują jej poziom w prążkowiu [64]. Szereg badań eksperymentalnych z wykorzystaniem gryzoni w wieku 4-16 tygodni oraz stosunkowo krótkim czasem podawania HFD (od 2 do 20 tygodni) potwierdził negatywny wpływ otyłości na układ dopaminergiczny [65-69]. Wyniki tych badań są cenne. Warto jednak zauważyć, że podobnie jak T2DM, PD jest chorobą występującą w dużej mierze u osób starszych (powyżej 60 r.ż.) [70]. Dlatego też ważne jest, aby odpowiedzieć na pytanie czy i jak T2DM wywołana przez długotrwałe przyjmowanie HFD wpływa na układ dopaminergiczny w trakcie starzenia się. Wzięcie pod uwagę tego czynnika jest istotne, gdyż zaobserwowano związane z wiekiem zmiany w tym układzie, które wywołują objawy przypominające wczesny parkinsonizm (ang.: pre-parkinsonian state) [70].

Wyniki badań dotyczących wpływu T2DM na układ nigrostriatalny w trakcie starzenia się zawarte zostały w publikacji nr 4.

Zastosowanie analogów GLP-1 oraz inhibitorów DPP-4 w zapobieganiu zmianom wywołanym przez cukrzycę typu 2 w układzie węchowym i nigrostriatalnym

Do leków nowej generacji stosowanych w leczeniu T2DM zaliczamy preparaty działające na układ inkretynowy (tzw. inkretyny to grupa hormonów jelitowych zwiększających poposiłkowe wydzielanie insuliny przez komórki β wysp trzustkowych), do których należą analogi glukagonopodobnego peptydu 1 (ang.: glucagon-like peptide-1, [GLP-1]) oraz inhibitory peptydazy dipeptydylowej 4 (ang.: dipeptidyl peptidase-4, [DPP-4]) [71]. Działanie tych leków wiąże się z małym ryzykiem hipoglikemii, ponadto są one dobrze tolerowane przez pacjentów i nie wywołują poważnych działań niepożądanych. Oprócz regulacji gospodarki węglowodanowej wykazano, że leki te mają działanie plejotropowe i korzystnie wpływają między innymi na układ sercowo-naczyniowy [71] oraz OUN [72, 73].

GLP-1 jest hormonem inkretynowym, który pobudza zależne od glukozy wydzielanie insuliny dzięki wiązaniu się ze specyficznym receptorem związanym z białkiem G (GLP-1R) [74]. Natywna forma GLP-1 ulega jednak szybkiej degradacji. Z tego powodu opracowano syntetyczny lek eksendynę 4 (ang.: exendin-4, [Ex-4]), która jest stabilną, syntetyczną formą GLP-1 i w chwili obecnej jest stosowana w leczeniu T2DM [74]. Jednak działanie Ex-4 nie ogranicza się wyłącznie do normalizacji glikemii: ma ona na tyle małą cząsteczkę, że przechodzi przez barierę krew-mózg [75], a badania przedkliniczne wykazały neuroprotekcyjne działanie zarówno tej inkretyny, jaki i innych analogów GLP-1 w kilku chorobach neurologicznych (podsumowane w: [76-78]). Liczne badania doświadczalne wykazały, że Ex-4 poprawia funkcje poznawcze nie tylko w AD [79-81], ale również w T2DM [82-84]. Niedawno opublikowane badanie kliniczne wykazało poprawę funkcji węchowych u pacjentów z T2DM otrzymujących analogi GLP-1 [24]. Brak danych na temat wpływu analogów GLP-1 na procesy zachodzące w układzie węchowym w T2DM skłonił mnie do zainteresowania się tym tematem. Wyniki badań dotyczących wpływu Ex-4 na wywołane przez T2DM zmiany w korze gruszkowatej znajdują się w publikacji nr 1.

Inną grupą leków przeciwcukrzycowych, które mają pozytywne działanie na OUN są inhibitory DPP-4, inaczej nazywane gliptynami. Są to leki podawane doustnie pacjentom z T2DM, a ich działanie polega między innymi na hamowaniu degradacji endogennego GLP-1 oraz glukozozależnego peptydu insulinotropowego (ang.: glucose-dependent insulinotropic peptide, [GIP]), co prowadzi do przedłużenia wydzielania insuliny po posiłku oraz efektu uwrażliwienia na jej działanie [85]. Niedawno opublikowane wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że inhibitory DPP-4 zmniejszają obszar uszkodzenia powstały w wyniku udaru mózgu zarówno u zwierząt z T2DM, jak i bez niej (przegląd w: [72, 73]). Wyniki badań sugerują również pozytywne działanie gliptyn w zwierzęcych modelach AD (przegląd w: [86]) oraz u pacjentów z T2DM i AD [87]. Inne badania wykazały, że inhibitory DPP-4 mają wpływ na układ dopaminergiczny. Leki te nie tylko mają działanie protekcyjne w obrębie układu nigrostriatalnego w zwierzęcym modelu PD [88], ale również zmniejszają częstość występowania PD u ludzi [89]. Co ciekawe, neuroprotekcyjny mechanizm działania przynajmniej niektórych inhibitorów DPP-4 może być niezależny od normalizacji glikemii [90] i GLP-1R [91, 92]. Jak dotąd brak było danych na temat wpływu inhibitorów DPP-4 na funkcje węchowe oraz ich skuteczności przeciwko zmianom wywołanym przez T2DM w układzie węchowym i układzie nigrostriatalnym. Wyniki badań, których celem było znalezienie odpowiedzi na te pytania znajdują się w publikacjach nr 2 i 4 cyklu.

CELE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

1. Określenie wpływu T2DM o różnej patogenezie na funkcje węchowe i mechanizmy neuroplastyczności oraz identyfikacja potencjalnych zmian patologicznych w wybranych strukturach układu węchowego
2. Określenie wpływu T2DM wywołanej przez długotrwałe przyjmowanie bogatej w tłuszcze diety prowadzącej do otyłości na strukturę i funkcje układu nigrostriatalnego w trakcie starzenia się
3. Ocena skuteczności analogów GLP-1 oraz inhibitorów DPP-4 w zapobieganiu zmianom patologicznym wywołanym przez T2DM w układzie węchowym i układzie nigrostriatalnym

OMÓWIENIE PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Publikacja nr 1

W ramach projektu, którego wyniki opublikowano w pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego, badałam wpływ cukrzycy na mechanizmy neuroplastyczności w korze gruszkowatej w genetycznym modelu T2DM. W projekcie wykorzystano szczury rasy Goto-Kakizaki (GK) w wieku 3 i 13 miesięcy, u których hiperglikemia rozwija się spontanicznie około trzeciego miesiąca życia [93]. Charakterystyczne dla tego modelu doświadczalnego jest również występowanie powikłań często obserwowanych u pacjentów z T2DM [94]. Dwie grupy kontrolne stanowiły szczury Wistar w tym samym wieku co GK. W badaniach zastosowano metody immunohistochemiczne i stereologiczne.

Wyniki badań morfologicznych wykazały, że niektóre NeuN-pozytywne neurony w korze gruszkowatej u 13-miesięcznych szczurów GK charakteryzowało nieregularne rozmieszczenie tego markera w obrębie jądra komórkowego. Efekt ten był nieobecny w pozostałych trzech grupach doświadczalnych. Ocena ilościowa pozytywnie wybarwionych komórek wykazała, że kora gruszkowata u 13-miesięcznych szczurów GK zawierała ok. 30% mniej neuronów o prawidłowej morfologii w porównaniu z 3-miesięcznymi GK (p<0,0001), a także 3-miesięcznymi (p<0,0001) i 13-miesięcznymi (p<0,01) szczurami z grup kontrolnych. Ponieważ interneurony GABA-ergiczne odgrywają ważną rolę w procesach plastyczności w obrębie kory gruszkowatej [95], a ponadto wykazano, że należąca do tej grupy subpopulacja komórek zawierających kalbindynę-D28k (CB) ma kluczowe znaczenie w patogenezie wywołanych przez T2DM powikłań w OUN, takich jak otępienie czy AD [96, 97], postanowiłam zbadać jaki wpływ ma T2DM na te komórki. Wykazałam, że w korze gruszkowatej u 13-miesięcznych szczurów GK liczba tych interneuronów jest mniejsza o ponad 50% nie tylko w porównaniu z 3-miesięcznymi i 13-miesięcznymi szczurami Wistar (odpowiednio p<0,01 i p<0,001), ale również z 3-miesięcznymi GK (p<0,05). Dodatkowo, w korze gruszkowatej u 13-miesięcznych szczurów GK GABA-ergiczne interneurony hamujące zwierające CB charakteryzował dramatyczny spadek liczby wypustek nerwowych (arboryzacji), co sugeruje upośledzenie mechanizmów neuroplastyczności w tym obszarze mózgowia. Efekt ten nie występował u młodych szczurów z T2DM.

W celu stwierdzenia czy T2DM wywołuje śmierć komórek w korze gruszkowatej w badanym modelu, dokonałam ilościowej oceny NeuN+ neuronów (o prawidłowej i nieprawidłowej morfologii). Potencjalną apoptozę oceniałam za pomocą metody TUNEL, a stres komórkowy poprzez ocenę ilościową komórek zawierających fosforylowaną na końcu N kinazę Jun (ang.: pJun-N-terminal kinase, [pJNK]). Wyniki nie wykazały różnic w liczbie neuronów pomiędzy grupami. Brak było również komórek z cechami apoptozy. Natomiast obecność podwójnie

wybarwionych komórek nerwowych NeuN/JNK+ w korze gruszkowatej obu grup GK świadczyła o indukowaniu przez T2DM stresu komórkowego w tym rejonie mózgowia.

Kolejnym istotnym pytaniem, na które chciałam uzyskać odpowiedź było to czy zidentyfikowanym zmianom wywołanym w korze gruszkowatej przez T2DM można przeciwdziałać stosując analog GLP-1, Ex-4. W tym celu lek przeciwcukrzycowy podawano dootrzewnowo (0.1 μg/kg, *i.p.*, dwa razy dziennie przez 6 tygodni) 9-miesięcznym szczurom GK, u których wykryto obecność zmian patologicznych w układzie węchowym. Grupę kontrolną stanowiły 9-miesięczne szczury GK, którym podawano PBS. Stosując metody immunohistochemiczne i stereologiczne, dokonano oceny ilościowej neuronów NeuN+ (o prawidłowej i nieprawidłowej morfologii), GABA-ergicznych interneuronów zawierających CB, a także komórek pJNK+ w korze gruszkowatej. Ponadto, z uwagi na istotną rolę w regulacji funkcji neuronów szlaku sygnałowego kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K-AKT), zbadałam wpływ Ex-4 na aktywację AKT w korze gruszkowatej szczurów z T2DM. Wyniki wykazały, że w korze gruszkowatej szczurów którym podawano Ex-4 było więcej NeuN+ neuronów o prawidłowej morfologii w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,01). Odnotowałam również wzrost liczby neuronów wstawkowych zawierających CB (p<0,0001). Wpływ Ex-4 na te neurony miał charakter neurotroficzny i wiązał się ze zwiększeniem ciała komórek nerwowych oraz większą arboryzacją ich wypustek. Spadek liczby komórek pJNK+ w korze gruszkowatej szczurów, którym podawano Ex-4 świadczy o tym, że ten analog GLP-1 redukuje stres komórkowy wywołany przez T2DM. Sześć tygodni podawania Ex-4 wywołało również umiarkowany wzrost fosforylacji AKT w zastosowanym modelu T2DM, co może sugerować działanie neuroprotekcyjne tego leku.

WNIOSEK

W powyższej pracy wykazano obecność patologii w populacji neuronów kory gruszkowatej u starzejących się szczurów z T2DM, która miała negatywny wpływ na interneurony GABA-ergiczne. Może ona stanowić istotny czynnik leżący u podstaw upośledzenia funkcji węchowych w T2DM. Zaobserwowanym zmianom morfologicznym można skutecznie przeciwdziałać poprzez zastosowanie analogów GLP-1.

<u>Publikacja nr 2</u>

Kontynuacją tematu badawczego jest następna publikacja cyklu, która zawiera wyniki badań dotyczących wpływu T2DM na funkcje węchowe, a także mechanizmy neuroplastyczności w dwóch kluczowych obszarach układu węchowego: opuszce węchowej i korze gruszkowatej. W genetycznym modelu T2DM, u szczurów GK w przedziale wiekowym od 4 do 7 miesięcy testowałam zdolność do wykrywania zapachów oraz pamięć węchową. W badaniach behawioralnych wykorzystałam test blokowy, test habituacji-dyshabituacji, a także test ukrytego granulatu [98]. Szczury rasy Wistar w tym samym wieku stanowiły grupę kontrolną. Mechanizmy neuroplastyczności badałam przy użyciu metod immuno-histochemicznych, stereologicznych oraz techniki Western blot.

W moich badaniach jako pierwsza wykazałam istotne upośledzenie funkcji węchowych w zastosowanym modelu T2DM. W porównaniu z grupą kontrolną, szczury GK spędzały mniej czasu wąchając nowe zapachy zarówno w teście blokowym, jak i teście habituacji-dyshabituacji. Ponadto, zwierzęta z T2DM potrzebowały znacznie więcej czasu na znalezienie, kierując się wyłącznie wskazówkami węchowymi, ukrytego granulatu. Aby ocenić pamięć węchową, kilkukrotnie mierzono czas jaki zwierzęta spędzały wąchając ten sam zapach (test habituacji-

dyshabituacji, w odstępach ok. 5 minutowych) oraz czas jaki zajęło im znalezienie przykrytego ściółką pokarmu (test ukrytego granulatu, w odstępach 1-dniowych). Wyniki wykazały, że w trakcie kolejnych prób szczury GK ani nie wąchały krócej tego samego zapachu (brak habituacji), ani nie znajdowały w krótszym czasie ukrytego granulatu, co obserwowano w kolejnych próbach u zwierząt z grupy kontrolnej. Świadczy to o upośledzeniu pamięci węchowej u szczurów z T2DM (zwierzęta, które pamiętają dany zapach wąchają go krócej w kolejnych próbach).

W badaniach morfologicznych (między innymi na podstawie oceny komórek mitralnych) nie zaobserwowałam zmian strukturalnych w opuszce węchowej u zwierząt z T2DM. Z uwagi na istotną rolę jaką w procesach neuroplastyczności w układzie węchowym odgrywają hamujące interneurony GABA-ergiczne, badałam wpływ T2DM na liczbę komórek zawierających CB, parwalbuminę (PV) i karletyninę (CR) oraz ekspresję tych białek w opuszce węchowej i korze gruszkowatej. Wyniki nie wykazały istotnych różnic między grupami pod względem liczby interneuronów zawierających PV i CR, a także poziomu ekspresji tych białek wiążących wapń w opuszce węchowej. Odnotowałam jednak 18% spadek poziomu białka CB u szczurów GK (p=0,04) w tym obszarze mózgowia, co może sugerować upośledzenie funkcji tej subpopulacji interneuronów GABA-ergicznych w badanym modelu cukrzycy. W poprzedniej pracy (publikacja nr 1) wykazałam negatywny wpływ T2DM na subpopulację interneuronów zawierających CB w korze gruszkowatej. W tym samym obszarze nie odnotowałam różnic pomiędzy grupami w gęstości interneuronów PV+. Jednakże wykazałam 17% spadek poziomu białka PV u szczurów z T2DM w porównaniu do grupy kontrolnej (p=0,046). Nie wykryłam istotnych różnic ani w gęstości subpopulacji interneuronów zawierających CR, ani w poziomie samego białka w korze gruszkowatej.

W celu określenia wpływu T2DM na neurogenezę w opuszce węchowej, oszacowałam liczbę neuroblastów zawierających doublekortynę (DCX). Wyniki wykazały ponad 50% spadek gęstości komórek DCX+ u szczurów GK w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,02), co wskazuje na negatywny wpływ T2DM na neurogenezę w opuszce węchowej. Aby ocenić wpływ T2DM na procesy neuroplastyczności związane z adaptacją do nowych zapachów, oszacowałam liczbę post-mitotycznych, niedojrzałych neuronów DCX+ w korze gruszkowatej u 6-miesięcznych szczurów GK. W badanym modelu cukrzycy całkowita liczba komórek DCX+ była o 168% wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Aby określić czy wzrost liczby neuronów DCX+ w korze gruszkowatej u szczurów GK wiązał się z upośledzeniem ich różnicowania, wykonałam podwójne znakowanie DCX (marker komórek prekursorowych i niedojrzałych neuronów) i NeuN (marker dojrzałych neuronów, który jest nabywany przez te komórki w trakcie procesu różnicowania). Wyniki wykazały 52% wzrost liczby komórek DCX/NeuN+ w korze gruszkowatej u starzejących się szczurów GK w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,049), co świadczy o upośledzeniu tempa różnicowania komórek DCX+ do dojrzałych neuronów (a tym samym tej formy neuroplastyczności) u szczurów z T2DM.

W ramach publikacji nr 2 badałam również skuteczność inhibitorów DPP-4 w zakresie ich potencjalnej zdolności poprawy funkcji węchowych oraz ich wpływu na procesy neuroplastyczności w opuszce węchowej i korze gruszkowatej w genetycznym modelu T2DM. Inhibitor DPP-4, linagliptynę, podawano w pożywieniu (83mg/kg mc, szacowane dzienne spożycie: 5-8 mg/kg mc) przez 16 tygodni. Szczury z grupy kontrolnej otrzymały ten sam granulat, ale bez leku. Wyniki badań wykazały, że linagliptyna podawana przez 16 tygodni szczurom GK nie poprawia ani zdolności do wykrywania zapachów ani pamięci węchowej. Nie stwierdziłam

również wpływu tego inhibitora na gęstość neuronów CB+ w opuszce węchowej. Odnotowałam natomiast 22% wzrost poziomu CB u szczurów, które otrzymały linagliptynę w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,002). Sugeruje to działanie normalizujące tego leku przeciwcukrzycowego na wywołany przez T2DM spadek poziomu białka CB w opuszce węchowej. Wyniki nie wykazały istotnych różnic w gęstości pozostałych interneuronów GABA-ergicznych, jak również w zawartości PV i CR w badanym obszarze mózgowia. Ponadto, po zastosowaniu linagliptyny nie stwierdziłam istotnych różnic w gęstości komórek DCX+ w opuszce węchowej w porównaniu z grupą kontrolną, co świadczy o braku wpływu tego inhibitora DPP-4 na neurogenezę w tym obszarze mózgowia. Wyniki badań wykazały ponad 40% wzrost liczby interneuronów CB+ w korze gruszkowatej u szczurów GK, które otrzymały linagliptynę w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,002), co sugeruje istotną rolę tego inhibitora DPP-4 w regulacji neuroplastyczności z udziałem tych komórek w badanej strukturze układu węchowego. Dodatkowo, średnia objętość ciał komórek CB+ u szczurów z T2DM, które otrzymały linagliptynę była o 14% większa w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,02). Linagliptyna wywołała również większą arboryzację dendrytów interneuronów GABA-ergicznych CB+ w grupie zwierząt z T2DM w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,02). Uzyskane dane morfometryczne wskazują na neurotroficzny wpływ linagliptyny na interneurony CB+, co sugeruje że inhibitory DPP-4 regulują neuroplastyczność z udziałem tych komórek w korze węchowej. Nie stwierdziłam wpływu linagliptyny na gęstość pozostałych subpopulacji interneuronów GABA-ergicznych tj. komórek PV+ i CR+, jak również na poziom tych białek w korze gruszkowatej. Podawana przez 16 tygodni linagliptyna nie miała również istotnego wpływu na liczbę komórek DCX+ w korze gruszkowatej szczurów GK. Jednakże u zwierząt otrzymujących lek nastąpił 36% spadek liczby neuronów DCX/NeuN+ w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,03), co świadczy o tym że linagliptyna pobudza te komórki do różnicowania.

WNIOSEK

W powyższej pracy udowodniono wpływ cukrzycy na funkcje węchowe w genetycznym modelu T2DM. Jako pierwsi wykazaliśmy, poprzez identyfikację określonych mechanizmów komórkowych, negatywny wpływ T2DM na procesy neuroplastyczności zarówno w opuszce węchowej, jak i korze gruszkowatej.

Zastosowanie inhibitora DPP-4 nie przyniosło poprawy funkcji węchowych takich jak zdolność do wykrywania zapachów i pamięć węchowa. Jednakże wyniki badań wykazały, że linagliptyna wpływa w układzie węchowym pozytywnie na parametry komórkowe związane z neuroplastycznością, które są upośledzone przez T2DM.

<u>Publikacja nr 3</u>

W kolejnej publikacji cyklu szukałam odpowiedzi na pytanie czy otyłość jest czynnikiem mającym wpływ na funkcje węchowe u diabetyków. Pytanie to jest istotne z uwagi na fakt, iż 85% pacjentów z T2DM to osoby otyłe. Nie wiadomo natomiast jak różne czynniki prowadzące do otyłości (np. różne składniki diety czy wzrost masy ciała *per se*) wpływają na poszczególne funkcje węchowe i jakie mechanizmy leżą u podstaw tych zjawisk. W celu uzyskania odpowiedzi na te pytania, badałam jaki wpływ mają dwa rodzaje diety prowadzącej do otyłości: 1) o dużej zawartości tłuszczu (HFD) i 2) o umiarkowanej zawartości tłuszczu i wysokiej zawartości cukru (WD) na wykrywanie oraz odróżnianie zapachów, związane z zapachem uczenie się, a także pamięć węchową u myszy. Badałam również wpływ obu rodzajów diety prowadzącej do otyłości (ang.: obesogenic diet) na neurogenezę, a także interneurony GABA-ergiczne oraz neuroblasty obecne w układzie węchowym. Ponadto, oszacowałam objętość kory węchowej, a także aktywność

neuronalną (w oparciu o ekspresję białka cFos [99]) w tej strukturze mózgu. W projekcie wykorzystano samce myszy C57/BL6j, u których wywołano T2DM poprzez karmienie jednym z dwóch rodzajów diety: HFD lub WD przez 8 miesięcy, począwszy od 5 tygodnia życia. W przypadku diety bogatej w tłuszcze (HFD), aż 54% energii pochodziło ze spalania tłuszczu, 29% energii ze spalania węglowodanów, a 17% z białka. W diecie „typu zachodniego" (WD) 42% energii pochodziło z tłuszczu, 43% z węglowodanów, a 15% ze spalania białka. Grupę kontrolną stanowiły myszy, które otrzymały zbalansowaną dietę (ang.: standard diet, [SD]). U zwierząt nią karmionych 58% energii pochodziło ze spalania węglowodanów (głównie skrobi), 18% z tłuszczu, a 24% z białka. Masa ciała oraz poziom glukozy we krwi były monitorowane w czasie trwania eksperymentu. Testy behawioralne wykonano po 1, 3 i 8 miesiącach od momentu wprowadzenia diety. Wartości stężenia insuliny w surowicy oraz glukozy we krwi (na czczo) wykorzystałam do obliczenia wskaźnika insulinooporności (ang.: HOMA index).

Już po 1 miesiącu myszy karmione zarówno HFD jak i WD miały większą masę ciała w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt ten utrzymał się po 3 miesiącach. Co ciekawe, nie zaobserwowałam istotnych różnic w masie ciała między SD a WD po 8 miesiącach przyjmowania diety. Jednakże myszy karmione HFD miały większą masę ciała zarówno w porównaniu ze SD (p<0,0001), jak i WD (p=0,002). Już po 1 miesiącu, odnotowałam podwyższone stężenie glukozy we krwi u myszy karmionych HFD (p=0,011) i WD (p=0,006), w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt ten utrzymał się po 3 i 8 miesiącach. W tym ostatnim punkcie czasowym, wskaźnik insulinooporności był podwyższony zarówno u myszy na diecie HFD (p<0,0001), jak i WD (p=0,0136), w porównaniu do SD. Dodatkowo, odnotowałam istotny wzrost tego wskaźnika w grupie HFD w porównaniu do WD (p=0,0175).

W badaniach behawioralnych, po 1 miesiącu przyjmowania diety nie zaobserwowałam różnicy w wykrywaniu zapachów pomiędzy grupami doświadczalnymi. Po 3 miesiącach, odnotowałam trend w kierunku zwiększenia czasu potrzebnego na znalezienie ukrytego pożywienia prezentowany zarówno przez myszy z grupy HFD, jak i WD, w porównaniu do SD (odpowiednio p=0,159 i p=0,191). Po 8 miesiącach, myszom z obu grup zajmowało znacznie więcej czasu znalezienie ukrytego pożywienia w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio p=0,016 i p=0,045), co sugeruje upośledzenie zdolności wykrywania zapachu. Nie zaobserwowałam różnic pomiędzy grupami pod względem zdolności do odróżniania zapachów, gdyż we wszystkich punktach czasowych myszy wąchały nieznany zapach znacznie dłużej w porównaniu do zapachu im wcześniej znanego. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęłam wniosek, że u myszy karmionych HFD i WD dochodzi do stopniowego upośledzenia zdolności wykrywania zapachów, ale nie ich odróżniania.

W testach behawioralnych badających związaną z zapachem zdolność uczenia się (ang.: odor-related learning), po 1 miesiącu przyjmowania diety prowadzącej do otyłości w żadnej z grup doświadczalnych nie zaobserwowałam różnic w długości czasu jaki myszy wąchały nowy dla nich zapach innego osobnika. Po 3 miesiącach, myszy z grupy WD wąchały nowy zapach znacznie krócej w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,046), co świadczy o upośledzeniu zdolności do uczenia się nowych zapachów. W tym samym punkcie czasowym, nie odnotowałam różnicy w czasie spędzonym na wąchaniu nowego zapachu społecznego (tj. innej myszy) między zwierzętami karmionymi SD i HFD. Po 8 miesiącach zaobserwowałam istotną redukcję czasu jaki myszy karmione zarówno HFD, jak i WD spędzały na wąchaniu nowego zapachu, w porównaniu ze SD (odpowiednio p=0,015 i p=0,049). Ponadto, we wszystkich punktach czasowych myszy z grup

eksperymentalnych wąchały krócej ten sam zapach innego osobnika w trakcie kolejnych prób, w porównaniu z czasem z pierwszej próby, co jest dowodem na habituację i świadczy o braku upośledzenia uczenia się nieskojarzonego. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęłam wniosek, iż oba rodzaje diety stopniowo upośledzają rozpoznawanie nowych zapachów (ale nie uczenie się nieskojarzone). Co istotne, deficyt ten pojawia się wcześniej u myszy karmionych WD.

W toku przeprowadzonych badań nie zaobserwowałam upośledzenia długotrwałej pamięci węchowej u myszy karmionych SD tzn. wąchały one nowy zapach dłużej w porównaniu ze znanym już im zapachem (prezentowanym 22 godziny wcześniej). Myszy z grupy HFD wąchały nowy zapach dłużej po 1 i 3 miesiącach, natomiast po 8 miesiącach spędzały porównywalną ilość czasu wąchając każdy z dwóch zapachów, co wskazuje na upośledzenie długotrwałej pamięci węchowej. W przypadku myszy z grupy WD, po 1 miesiącu wąchały one nowy zapach dłużej w porównaniu z zapachem poznanym 22 godziny wcześniej (p=0,007). W pozostałych punktach czasowych wyniki wykazały brak istotnych różnic w długości czasu wąchania obu prezentowanych zapachów, co sugeruje że myszy karmione WD nie pamiętały zapachu z dnia poprzedniego i traktowały oba zapachy jako „nowe", czyli miały upośledzoną długotrwałą pamięć węchową. Dowodzi to, że wywołana przez otyłość T2DM stopniowo upośledza pamięć węchową. Zaburzenie to pojawia się wcześniej u osobników karmionych WD niż HFD.

W poszukiwaniu mechanizmów prowadzących do zaburzeń węchowych, badałam wpływ T2DM na procesy neurogenezy, neuroplastyczności oraz aktywność neuronalną w układzie węchowym. W celu oceny migracji neuronalnych komórek macierzystych ze strefy okołokomorowej komór bocznych (gdzie powstały) do opuszki węchowej, oszacowałam gęstość komórek BrdU+ w tej strukturze układu węchowego. Aby określić czy HFD i WD mają wpływ na neurogenezę u osobników dorosłych, obliczyłam procent neuronów NeuN/BrdU+ w badanych grupach doświadczalnych. Wyniki wykazały brak wpływu HFD i WD na gęstość komórek BrdU+ oraz liczebność komórek NeuN/BrdU+ w opuszce węchowej, co sugeruje, że przynajmniej po 8 miesiącach przyjmowania, ani HFD ani WD nie mają wpływu na neurogenezę w tym obszarze mózgowia.

Inną strukturą układu węchowego będącą przedmiotem moich zainteresowań była kora gruszkowata. Aby określić czy HFD i WD wywołują zmiany makroskopowe w tym obszarze mózgowia (jest on odpowiedzialny między innymi za kodowanie zapachów i przesyłanie informacji do innych rejonów mózgowia), wykonałam pomiar morfometryczny tej struktury. Wyniki nie wykazały istotnych różnic w objętości kory gruszkowatej u myszy karmionych HFD i WD, w porównaniu z grupą kontrolną. Ocena gęstości GABA-ergicznych interneuronów hamujących zawierających kalbindynę i somatostatynę w korze gruszkowatej również nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami otrzymującymi diety prowadzące do otyłości i grupą kontrolną. Oceniałam również wpływ obu typów diety na niedojrzałe neurony DCX+ w korze gruszkowatej. Komórki te odgrywają ważną rolę w procesach neuroplastyczności w układzie węchowym (patrz Wstęp). Wyniki wykazały brak istotnych różnic pod względem całkowitej liczby komórek DCX+ u myszy HFD i WD w porównaniu z grupą kontrolną, przynajmniej po 8 miesiącach od rozpoczęcia diety. Dodatkowo, w celu oceny potencjalnych różnic w aktywności neuronalnej w korze gruszkowatej, oszacowałam gęstość komórek cFos/NeuN+ w tej strukturze mózgowia. Wyniki wykazały brak różnic między grupami, po 8 miesiącach stosowania diet prowadzących do otyłości.

WNIOSEK

Przedstawione wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę na temat wpływu diet prowadzących do otyłości na funkcje węchowe w T2DM. Poza potwierdzeniem szkodliwego wpływu HFD i WD na funkcje węchowe w przebiegu cukrzycy, zidentyfikowaliśmy specyficzny efekt charakterystyczny dla WD tj. przyśpieszenie występowania zaburzeń uczenia się związanego z odbiorem bodźców zapachowych oraz upośledzenia pamięci węchowej. Sugeruje to, iż wysoka zawartość węglowodanów prostych w diecie, w połączeniu ze znaczną zawartością tłuszczu, może przyśpieszyć pogorszenie się związanych z węchem funkcji poznawczych.

Publikacja nr 4

W ostatniej publikacji cyklu badałam wpływ T2DM na układ nigrostriatalny w trakcie starzenia się. W badaniach wykorzystano samce myszy C57/BL6j, które były karmione dietą standardową (SD) lub dietą bogatą w tłuszcze (HFD), począwszy od 2. miesiąca życia przez 6 i 12 miesięcy, a także 2-miesięczne myszy karmione SD. Skutkiem długotrwałego przyjmowania HFD była otyłość oraz nietolerancja glukozy/T2DM. W pracy badano wpływ T2DM i starzenia się na stężenie i uwalnianie dopaminy (DA) w prążkowiu. Do określenia podstawowego i stymulowanego amfetaminą zewnątrzkomórkowego stężenia DA (podanie tej substancji stymulującej umożliwia obserwację tego jak DA jest uwalniana w czasie) użyto technikę mikrodializy. Do oznaczenia całkowitego stężenia DA w prążkowiu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (ang.: high-performance liquid chromatography, [HPLC]). Do wykrycia potencjalnych zmian wywołanych przez T2DM i starzenie się w neuronach i neurogleju w układzie nigrostriatalnym myszy zastosowano techniki immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne. Średnią objętość komórek oceniono wykorzystując technikę nukleatora [100].

Uzyskane wyniki wykazały spadek uwalniania DA w prążkowiu u 14-miesięcznych myszy karmionych HFD w porównaniu z myszami karmionymi SD w tym samym wieku (p<0,0001). Efekt ten nie występował u młodych myszy karmionych SD (2-miesięczne *versus* 14-miesięczne myszy SD), czyli był niezwiązany z wiekiem. Następnym etapem było porównanie wyjściowego, zewnątrzkomórkowego poziomu DA przed podaniem amfetaminy w badanych grupach. Stwierdziliśmy redukcję zewnątrzkomórkowego stężenia DA w prążkowiu zwierząt karmionych HFD. W celu ustalenia czy efekt ten był wywołany ogólnym spadkiem zawartości DA w prążkowiu, lizaty z tkanki poddano analizie HPLC. Wyniki pokazały brak wpływu zarówno T2DM, jak i starzenia się na całkowitą zawartość DA w prążkowiu.

Analiza ilościowa neuronów wykazała, że ani starzenie się ani T2DM nie mają wpływu na całkowitą liczbę dopaminergicznych neuronów w istocie czarnej oraz na gęstość DARPP-32+ neuronów kolczystych średniej wielkości oraz interneuronów GAD67+ w prążkowiu. Należy nadmienić, że GAD jest enzymem konwertującym glutaminian do kwasu γ-aminomasłowego, który jest obecny w neuronach GABA-ergicznych w prążkowiu. Ponadto, w oparciu o ocenę poziomu białka Hsp70/72, nie stwierdziłam uszkodzenia neuronów w prążkowiu myszy z T2DM. Wyniki ilościowej oceny subpopulacji interneuronów GABA-ergicznych w prążkowiu wykazały indukowany wiekiem spadek gęstości interneuronów zawierających parwalbuminę (PV) (porównanie dotyczyło 2-miesiecznych i 14-miesięcznych myszy SD, p=0,0213). Innym skutkiem starzenia się było zmniejszenie średniej objętości interneuronów PV+ (porównano 2-miesieczne i 14-miesięczne myszy SD, p=0,0274). Nie stwierdziłam dodatkowego wpływu T2DM na którykolwiek z tych parametrów.

W celu wykrycia potencjalnej indukcji odpowiedzi zapalnej, dokonałam analizy ilościowej komórek mikrogleju zawierających Iba-1+ oraz reaktywnych astrocytów znakowanych GFAP+ w prążkowiu. Wyniki ujawniły wywołany wiekiem wzrost gęstości komórek Iba-1+ w tej strukturze mózgowia (porównanie 2-miesiecznych i 14-miesięcznych myszy SD, p<0,0001; oraz porównanie 2-miesiecznych myszy SD i 14-miesięcznych myszy HFD, p<0,0001). Wykazałam również związany z wiekiem wzrost średniej objętości komórek Iba-1+ (p<0,0001). Podobnie jak w przypadku mikrogleju, u 14-miesięcznych myszy karmionych SD odnotowałam wzrost gęstości astrocytów GFAP+ w porównaniu do młodych osobników (p=0,0002). Powyższe obserwacje dotyczą starzenia się. Nie zaobserwowałam wpływu T2DM na żadną z badanych populacji komórek neurogleju.

W celu zbadania wpływu T2DM na linię oligodendrocytów, najpierw oszacowano liczbę komórek, w których dochodzi do ekspresji czynnika transkrypcyjnego Olig2, a więc komórek będących w fazie dojrzewania. W przebiegu procesu starzenia zaobserwowałam zmniejszenie gęstości komórek Olig2+ w prążkowiu (porównanie 2-miesiecznych myszy SD i 14-miesięcznych SD, p<0,0001; oraz 2-miesiecznych myszy SD i 14-miesięcznych HFD, p<0,0001), jednak T2DM nie miała dodatkowego wpływu na ten parametr. Świadczy to o zmniejszeniu liczebności tej linii oligodendrocytów wraz z wiekiem. Dodatkowo, u 14-miesięcznych myszy karmionych SD wykazałam redukcję o połowę liczby komórek Olig2/PCNA+ (PCNA jest markerem proliferujących komórek) w stosunku do całkowitej populacji komórek Olig+ w prążkowiu (p=0,0065). T2DM nie miała dodatkowego wpływu na liczebność tej populacji komórek. Następnie oszacowaliśmy gęstość niedojrzałych komórek oligodendrogleju, które zawierały receptor GPR17 (marker komórek prekursorowych, aż do stadium niedojrzałych oligodendrocytów), a także gęstość bardziej zróżnicowanych oligodendrocytów zawierających GSTπ. Wyniki wykazały spadek gęstości komórek GPR17+ w prążkowiu 14-miesięcznych myszy SD w porównaniu z 2-miesięcznymi myszami karmionymi tą samą dietą (p=0,0002). T2DM częściowo zahamowała ten efekt (porównanie 14-miesięcznych myszy SD i 14-miesięcznych myszy HFD, p=0,036). Ocena gęstości komórek GSTπ+ wykazała ich spadek wraz z wiekiem (porównanie 2-miesięcznych myszy SD i 14-miesięcznych myszy SD, p=0,0136). Nie stwierdziłam wpływu T2DM na tę populację komórek.

W publikacji nr 4 zamieściłam również wyniki badań nad wpływem dwóch leków przeciwcukrzycowych: inhibitora DPP-4 linagliptyny (podawanej w pokarmie, ok. 5-7 mg/kg mc/dzień, przez 3 miesiące) oraz pochodnej sulfonylomocznika glimepirydu (podawanego w pokarmie, ok. 2-4 mg/kg m.c./dzień, przez 3 miesiące) na wywołane przez T2DM zmiany w układzie nigrostriatalnym. Wyniki wykazały, że ani linagliptyna, ani glimepiryd nie miały wpływu na całkowity poziom DA w prążkowiu. Jednakże obecność istotnej statystycznie interakcji pomiędzy lekiem a czasem po stymulacji amfetaminą (p=0,0015) w dwuczynnikowej analizie wariancji (ang.: two-way ANOVA) sugerowała, że uwalnianie DA w czasie różniło się pomiędzy grupami. Dalsza analiza ujawniła, że oba zastosowane leki przeciwcukrzycowe zapobiegają spadkowi uwalniania DA u starzejących się myszy z T2DM (p<0,0001).

Linagliptyna nie miała wpływu ani na gęstość komórek PV+, ani na ich średnią objętość. Po zastosowaniu glimepirydu zaobserwowano natomiast dalszy spadek objętości komórek tej populacji w prążkowiu (porównanie 14-miesięcznych myszy HFD i 14-miesięcznych myszy HFD, które otrzymały glimepiryd, p=0,013). Żaden z zastosowanych leków nie miał wpływu na gęstość komórek mikrogleju, ale w grupie która otrzymała linagliptynę zaobserwowałam spadek średniej

objętości tych komórek (porównanie 14-miesięcznych myszy HFD i 14-miesięcznych myszy HFD, które otrzymały linagliptynę, p=0,0126). Efekt ten nie występował w przypadku glimepirydu. Po zastosowaniu linagliptyny, ale nie glimepirydu, doszło również do redukcji gęstości astrocytów GFAP+ w prążkowiu (p=0,033). Linagliptyna nie miała wpływu na całkowitą liczbę komórek Olig2+, ale u myszy HFD które ją otrzymały zaobserwowano zwiększenie frakcji komórek Olig2/PCNA+ (p=0,0476), co sugeruje że zastosowanie tego inhibitora DPP-4 częściowo przywróciło zdolność tych komórek do proliferacji. Glimepiryd wywołał wzrost całkowitej liczby komórek Olig2+ (p<0,0001), ale nie wywołał wzrostu odsetka komórek proliferujących (p=0,4253). Inhibitor DPP-4 wywołał wzrost gęstości zarówno komórek GPR17+ (p=0,0017), jak i GSTπ+ (p=0,0478) w prążkowiu myszy HFD, podczas gdy w przypadku glimepirydu nie odnotowano istotnych różnic w gęstości obu tych populacji komórkowych w porównaniu z grupą otrzymującą tylko HFD.

WNIOSEK

W pracy wykazano, że T2DM prowadzi do spadku zewnątrzkomórkowego stężenia DA w prążkowiu, a także istotnego upośledzenia uwalniania tego neuroprzekaźnika z zakończeń aksonalnych po stymulacji amfetaminą. Sugeruje to niekorzystny wpływ T2DM na regulację funkcji motorycznych. Wyjaśnienie roli T2DM we wczesnym stadium zaburzeń ruchowych związanych ze zmianami w układzie nigrostriatalnym wymaga dalszych badań.

Zaobserwowaliśmy również związane ze starzeniem, chociaż niezależne od T2DM czy zmian poziomu DA w prążkowiu, zmiany w neuronach i komórkach glejowych. Zmianom w obrębie neurogleju można przeciwdziałać stosując linagliptynę, a w mniejszym stopniu również glimepiryd.

POSUMOWANIE

1) T2DM, zarówno o podłożu genetycznym jak i wywołana przyjmowaniem diety prowadzącej do otyłości, wpływa negatywnie na funkcje węchowe prowadząc do zaburzenia zdolności wykrywania zapachów, uczenia się opartego o bodźce zapachowe, a także pamięci węchowej. Zmiany te pojawiają się szybciej w przypadku tzw. „diety zachodniej" (WD) niż diety bogatej w tłuszcze (HFD). T2DM prowadzi również do upośledzenia mechanizmów neuroplastyczności w układzie węchowym (zarówno w opuszce węchowej, jak i korze gruszkowatej), a wraz z wiekiem u osobników z T2DM pojawiają się zmiany patologiczne w GABA-ergicznych interneuronach kory gruszkowatej.
2) T2DM wywołana przez długotrwałe przyjmowanie HFD nie ma wpływu na całkowite stężenie dopaminy w układzie nigrostriatalnym. Wywołuje ona natomiast upośledzenie jej uwalniania do przestrzeni synaptycznej, a w konsekwencji spadek zewnątrzkomórkowego stężenia tego neuroprzekaźnika w prążkowiu, co może tłumaczyć występowanie zaburzeń motorycznych u osób z T2DM.
3) a) Zastosowanie analogów GLP-1 ogranicza pojawianie się zmian patologicznych w GABA-ergicznych interneuronach kory gruszkowatej u szczurów z T2DM w trakcie starzenia się.
   b) Inhibitory DPP-4 nie mają wpływu na funkcje węchowe, jednak ich zastosowanie poprawia upośledzone przez T2DM mechanizmy neuroplastyczności w układzie węchowym. Regulacja poziomu glikemii w wyniku działania inhibitora DPP-4 linagliptyny (ale również pochodnej sulfonylomocznika, glimaperidu) normalizuje upośledzone przez T2DM uwalnianie dopaminy w prążkowiu. Wpływa również pozytywnie na zmiany zachodzące z wiekiem w komórkach neurogleju w układzie węchowym.

ZNACZENIE I POTENCJALNE WYKORZYSTANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

- Uzyskane wyniki dotyczące negatywnego wpływu T2DM na pamięć węchową stanowią mocne przesłanki do wykorzystania oceny tego parametru w przyszłych badaniach klinicznych jako wskaźnika prognostycznego pogorszenia funkcji poznawczych u osób z T2DM.
- Odkryte przez nas upośledzenie mechanizmów neuroplastyczności w układzie węchowym może mieć kluczowe znaczenie dla lepszego zrozumienia wpływu T2DM na percepcję bodźców węchowych, jak również wzajemnych zależności pomiędzy uszkodzeniem układu węchowego a pogorszeniem pamięci i funkcji poznawczych u diabetyków.
- Przedstawione wyniki badań poszerzają stan naszej wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw korzystnego działania inhibitorów DPP-4 na OUN w T2DM. Wiedza ta może zostać wykorzystana do opracowania terapii prewencyjnych przeciwko upośledzeniu funkcji poznawczych u pacjentów z T2DM.
- Wczesne pojawienie się deficytów węchowych wywołanych przez WD, jeśli zostanie potwierdzone u ludzi, będzie można wziąć pod uwagę przy opracowywaniu protokołów badań przesiewowych oceniających występowanie deficytów węchowych u ludzi z otyłością i T2DM. W dalszej perspektywie może to pozwolić na wdrożenie działań mających na celu przeciwdziałanie pojawieniu się zaburzeń pamięci i upośledzeniu funkcji poznawczych w tej grupie pacjentów.
- Regulacja glikemii może normalizować upośledzone przez T2DM uwalnianie dopaminy w prążkowiu. Chociaż wymaga to potwierdzenia w toku dalszych badań, uzyskane wyniki sugerują iż zwiększona produkcja insuliny *per se*, bądź też będąca jej konsekwencją zmniejszona glukotoksyczność, może zapobiegać lub opóźniać pojawienie się zaburzeń motorycznych związanych z dysfunkcją układu nigrostriatalnego u pacjentów z T2DM.
- Inhibitory DPP-4 mogą normalizować pojawiające się wraz z wiekiem zmiany w komórkach glejowych, a dzięki temu wykazywać właściwości opóźniające procesy starzenia się. Właściwości te mogłyby zostać wykorzystane w leczeniu zaburzeń motorycznych związanych ze starzeniem się.

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

W trakcie mojej kariery zawodowej prowadziłam badania naukowe w trzech ośrodkach:
A) Krajowym Ośrodku ds. Grypy w Państwowym Zakładzie Higieny[#] (2005)
B) Zakładzie Anatomii i Neurobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2005-2014, 2021-do chwili obecnej)
C) Department of Clinical Science and Education w Karolinska Institutet (2014-2020)

A) KRAJOWY OŚRODEK DS. GRYPY, PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY, WARSZAWA

W roku 2005 zostałam oddelegowana do pracy w Krajowym Ośrodku ds. Grypy w Państwowym Zakładzie Higieny, kierowanym przez prof. dr hab. Lidię B. Brydak.

[#] od 2021 roku Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Instytut Badawczy

Do głównych zadań tego ośrodka referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia należy nadzór epidemiologiczny i wirusologiczny nad grypą w naszym kraju, a także szerzenie wiedzy w społeczeństwie w zakresie profilaktyki przeciwko grypie. Do moich obowiązków należało:

- wykonywanie testów diagnostycznych w kierunku obecnych sezonowo szczepów wirusa grypy oraz innych wirusów oddechowych, a także kontrola jakości wypuszczanych na rynek szczepionek
- prowadzenie szkoleń dla personelu stacji sanitarno-epidemiologicznych z zakresu metod diagnostyki wirusa grypy
- wdrożenie zintegrowanego systemu nadzoru wirusologicznego i epidemiologicznego nad grypą: SENTINEL (*https://sentinel.pzh.gov.pl)* w naszym kraju

Rezultatem mojej pracy w tym ośrodku jest współautorstwo w 2 publikacjach: podsumowującej pierwszy sezon funkcjonowania systemu SENTINEL w naszym kraju oraz pracy kazuistycznej opisującej diagnostykę w kierunku wirusa grypy u pacjenta z podejrzeniem białaczki:

- Brydak L.B., **Lietzau G**., Machała M. (2005) Diagnostyka wirusowych infekcji oddechowych u pacjentów hospitalizowanych i pacjentów leczonych ambulatoryjnie objętych programem SENTINEL w sezonie 2004/05 w Polsce, *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej,* vol. 114(4):958-967 (MEiN 5)
- Brydak L.B., Gawryluk D., **Lietzau G**., Wiatr E., Machała M. (2006) Diagnostyka grypy u pacjenta z podejrzeniem białaczki, *Polski Merkuriusz Lekarski,* vol. 20(117):341-344 (MEiN 5)

Ostatnia w wymieniowych prac powstała przy **współpracy** z zespołem prof. dr hab. n. med. Elżbiety Wiatr z III Kliniki Chorób Płuc – Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, w Warszawie.

B) ZAKŁAD ANATOMII I NEUROBIOLOGII, WYDZIAŁ LEKARSKI, GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, GDAŃSK

W listopadzie 2005 rozpoczęłam pracę na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (ówczesnej Akademii Medycznej), w Zakładzie Anatomii i Neurobiologii kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Janusza Morysia. Główne obszary moich zainteresowań w ramach prowadzonej działalności naukowej to:

I. Mechanizmy śmierci komórkowej oraz rola gleju w ostrej fazie udaru mózgu[*,**] (3 publikacje)

II. Neuroprotekcyjne działanie statyn[**] **oraz inhibitorów kinaz tyrozynowych w udarze niedokrwiennym mózgu** (1 monografia naukowa, 1 publikacja)

III. Rola układu żylnego w ośrodkowym układzie nerwowym oraz regulacja mózgowego przepływu krwi w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych[**] (2 publikacje)

IV. Wpływ stresu na układ limbiczny w trakcie starzenia się[**] (2 publikacje)

V. Neuroplastyczność, jej mechanizmy w strukturach korowo-zależnych[**] **i układzie nagrody, oraz wpływ uzależniających substancji psychoaktywnych** (4 publikacje)

VI. Jednostka nerwowo-naczyniowa – jej struktura i funkcje w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych[**]**, a także jako potencjalne źródło biomarkerów udaru mózgu** (3 publikacje)

Opisany poniżej dorobek naukowy powstał przy **współpracy** krajowej i międzynarodowej z:

- Zakładem Neuroanestezjologii GUMed (prof. dr hab. n. med. Zbigniew Karwacki)
- Katedrą i Zakładem Farmakologii GUMed (prof. dr hab. n. med. Ivan Kocić)
- Instytutem Nauk o Zdrowiu, Akademia Pomorska w Słupsku (dr n. med. Monika Waśkow)
- AB Science, SA, Francja (prof. Olivier Hermine, dr Patrice Dubreuil)

I. Mechanizmy śmierci komórkowej oraz rola gleju w ostrej fazie udaru mózgu

Jednym z projektów, nad którymi pracowałam pod kierunkiem dr hab. n. med. Przemysława Kowiańskiego były mechanizmy programowanej śmierci komórkowej (ang.: programmed cel death, [PCD]) w udarze niedokrwiennym mózgu. Zainteresowało nas zagadnienie wrażliwości na niedokrwienie zróżnicowanych pod względem filogenetycznym i morfologicznym rejonów mózgowia: kory nowej, kory starej (do której zalicza się sektory CA1 i CA2 hipokampa), a także prążkowia oraz aktywacja w ich obrębie odmiennych, ewolucyjnie odległych szlaków PCD (tj. kaspazo-niezależnego, z udziałem białka AIF oraz kaspazo-zależnego, w którym dochodzi do aktywacji kaspaz 3, 8 i 9). W ostrej fazie udaru niedokrwiennego (1 godz. reperfuzji po 1 godz. zamknięcia t. środkowej mózgu), w korze nowej wykazaliśmy aktywację wyłącznie szlaku kaspazo-zależnego. W badanych sektorach hipokampa i prążkowiu doszło do aktywacji obu szlaków, jednak w tym ostatnim nie stwierdziliśmy aktywacji szlaku zewnątrzkomórkowego (z udziałem kaspazy 3 i 8) w tak wczesnej fazie udaru. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowaliśmy wiosek, że w strukturach OUN kształtujących się na różnych etapach rozwoju ewolucyjnego występują procesy śmierci komórkowej z udziałem filogenetycznie odmiennych mechanizmów.

W naszych badaniach wykorzystaliśmy jeden z najczęściej stosowanych zwierzęcych modeli doświadczalnych udaru niedokrwiennego mózgu polegający na czasowym zamknięciu tętnicy środkowej mózgu przy pomocy monofilamentowej nici chirurgicznej (ang.: Middle Cerebral Artery Occlusion [MCAO], intrafilament technique). Ten najczęściej stosowany w badaniach nad neuroprotekcją w udarze niedokrwiennym mózgu model [101] charakteryzuje mała inwazyjność (nie wymaga kraniotomii), wysoka powtarzalność (najmniejszą zmienność w zakresie wielkości obszaru niedokrwienia wykazują, wykorzystane również w naszych badaniach, szczury rasy Wistar), możliwość precyzyjnej kontroli nad czasem trwania niedokrwienia i reperfuzją, a procedura jego wykonania jest stosukowo prosta i niezbyt czasochłonna. Model ten uważa się za odpowiedni do odtworzenia warunków udaru niedokrwiennego w zakresie unaczynienia tętnicy środkowej mózgu oraz będącej jego następstwem śmierci komórkowej, procesów zapalnych i uszkodzenia bariery krew-mozg. Jego zastosowanie daje również dobre wyniki w testach behawioralnych [102]. Ograniczeniem tego modelu doświadczalnego jest duży obszar niedokrwienia, ryzyko perforacji naczynia przy wprowadzaniu nici co może prowadzić do krwawienia podpajęczynówkowego, a także częsta hipertermia wynikająca z przypadkowego uszkodzenia podwzgórza [102].

Zarówno ten, jak i pozostałe modele udaru mózgu posiadają wady i zalety, które należy wziąć pod uwagę planując badania. Nasze doświadczenia w tym zakresie zawarliśmy w pracy poglądowej, w której przedstawiliśmy ogólną charakterystykę zwierzęcych modeli doświadczalnych procesu niedokrwiennego mózgowia oraz czynniki mające wpływ na wyniki badań z zastosowaniem tych

---

* Powszechnie stosowane terminy: „choroby naczyniowe mózgu" i „udar mózgu" z punktu widzenia anatomicznego są nieprecyzyjne, ponieważ zaburzenia krążenia mogą wystąpić również w obrębie móżdżku i pnia mózgowia, a nie tylko w samym mózgu obejmującym struktury kresomózgowia i międzymózgowia (podział akceptowany przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne). Jednak w piśmiennictwie naukowym, a zwłaszcza klinicznym dość powszechne jest zamienne stosowanie nazw mózg i mózgowie w odniesieniu do wspomnianych trzech części OUN. W zastosowanym w moich badaniach modelu udaru dochodzi do zamknięcia tętnicy środkowej mózgu, więc *de facto* niedokrwienia w obrębie mózgu, dlatego też zdecydowałam się na użycie tego terminu.

** Tematy badawcze realizowane przed doktoratem

modeli, podsumowaliśmy przyczyny rozbieżności obserwowanych między badaniami doświadczanymi i klinicznymi, a także przedstawiliśmy sugestie czym się kierować przy doborze modelu doświadczalnego do badań.

Kolejnym obszarem moich zainteresowań przed uzyskaniem stopnia doktora była astroglioza w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgowia, a zwłaszcza pochodzenie indukowanych przez ten proces patologiczny reaktywnych, proliferujących komórek glejowych, które nie zostało ostatecznie wyjaśnione. Potencjalnymi kandydatami były glejowe komórki progenitorowe oraz komórki podlegające procesowi odróżnicowania (powrotu do stanu niezróżnicowanego). Czynnik transkrypcyjny Pax6 jest markerem tego procesu w astrocytach. Celem badań, w których brałam udział była ocena dynamiki odpowiedzi morfologicznej i proliferacyjnej astrogleju w ostrej i przewlekłej fazie udaru niedokrwiennego mózgu (do 6 tygodni). Silną reaktywność astrocytów, a także zdolność do odróżnicowania wyrażoną jako wzrost liczby komórek GFAP/Pax6+ oraz ich hipertrofię, odnotowaliśmy w korze mózgu i prążkowiu już 24 h po wywołaniu niedokrwienia. Ciekawą obserwacją był spadek gęstości podwójnie wyznakowanych komórek GFAP/Pax6+ wraz ze wzrostem odległości od centrum ogniska niedokrwiennego. Maksymalne nasilenie reakcji astrogleju było obecne w pierwszym tygodniu po udarze. Zgodnie z oczekiwaniami, hypertrofia oraz proliferacja astrogleju były bardziej nasilone w prążkowiu niż w korze mózgu.

Wyniki badań oraz zestawienie stosowanych w badaniach doświadczalnych modeli udaru niedokrwiennego mózgu opublikowano:

- **Lietzau G.,** Kowiański P., Karwacki Z., Dziewiątkowski J., Witkowska M., Sidor-Kaczmarek J., Moryś J. (2009) The molecular mechanisms of cell death in the course of transient ischemia are differentiated in evolutionary distinguished brain structures. *Metabolic brain disease,* vol. 24(3):507-523; DOI: 10.1007/s11011-009-9149-2 (IF 1,959; MEiN 20)
- Kowiański P., **Lietzau G**., Dziewiątkowski J., Moryś J. (2009) Doświadczalne modele zwierzęce udaru niedokrwiennego mózgowia, *Interdisciplinary problems of stroke,* vol. 11(2):70-79 (MEiN 2)
- Steliga A., Waśkow M., Karwacki Z., Wójcik S., **Lietzau G.**, Klejbor I., Kowiański P., (2013) Transcription factor Pax6 is expressed by astroglia after transient brain ischemia in the rat model. *Folia neuropathologica,* vol. 51(3):203-213; DOI: 10.5114/fn.2013.37704 (IF 1,667; MEiN 15)

II. Neuroprotekcyjne działanie statyn oraz inhibitorów kinaz tyrozynowych w udarze niedokrwiennym mózgu

Wobec braku w pełni skutecznej metody leczenia udaru niedokrwiennego mózgu, w dalszym ciągu opracowywane są nowe strategie terapeutyczne, których skuteczność weryfikuje się w pierwszej kolejności w badaniach na zwierzętach. Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej, była ocena neuroprotekcyjnego działania statyn w warunkach nieodwracalnego niedokrwienia mózgowia spowodowanego zamknięciem tętnicy środkowej mózgu (MCAO) u szczura. Opublikowane w rozprawie doktorskiej rezultaty badań wykazały, że simwastatyna stosowana dotychczas w leczeniu dislipidemii, podawana szczurom doustnie w dawce 20 mg/kg mc przez 3 dni przed wywołaniem niedokrwienia powodowała istotne zmniejszenie objętości obszaru ogniska niedokrwiennego. W pierwszej dobie po MCAO obszar ten stanowił 12,1±5% całego mózgu w grupie zwierząt, którym podawano lek, w porównaniu z 24,3±9,4% u szczurów otrzymujących sól fizjologiczną. Redukcji obszaru niedokrwienia towarzyszyła poprawa funkcji neurologicznych, które badano 3, 6, 16 i 24 godziny po zabiegu. Odsetek zwierząt prezentujących ciężkie zaburzenia funkcji motorycznych (3. stopień w skali Bedersona) wynosił w kolejnych godzinach odpowiednio 66, 61, 73 i 57%. W grupie otrzymującej

lek, odsetek zwierząt z takimi zaburzeniami wynosił odpowiednio: 17, 20, 15 i 29%. Uzyskane wyniki sugerują neuroprotekcyjne działanie statyn u pacjentów z zaburzeniami gospodarki lipidowej, u których występuje udar niedokrwienny mózgu.

Badania z wykorzystaniem modelu MCAO udaru niedokrwiennego mózgu kontynuowałam również po uzyskaniu doktoratu. Model ten zastosowaliśmy do badania wpływu inhibitorów kinaz tyrozynowaych na wielkość ogniska niedokrwiennego i deficyty neurologiczne w ostrej fazie udaru mózgu. Prace badawcze prowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii GUMed pod kierunkiem prof. Ivana Kocica. Zastosowana substancja, masytinib, blokuje wybiórczo stosunkowo niewielką liczbę receptorów (m.in. receptor c-Kit, PDGFR, Lyn oraz kinazy ogniskowo-adhezyjnej). Dlatego też uważa się ją za jeden z najbezpieczniejszych preparatów z tej grupy. Jednak jak dotąd nie został on dopuszczony do stosowania u ludzi i jest wykorzystywany wyłącznie w onkologii weterynaryjnej (w leczeniu nieoperacyjnych guzów komórek tłuszczowych). Wyniki badań pokazały, że podawany szczurom z MCAO masytinib w monoterapii (25 mg/kg lub 100 mg/kg mc, dwa razy dziennie przez 7 dni) istotnie zmniejsza wielkość ogniska niedokrwiennego w sposób zależny od dawki. Najsilniejszy efekt neuroprotekcyjny odnotowaliśmy w grupach doświadczalnych, które otrzymały masytinib w kombinacji z rekombinowanym tkankowym aktywatorem plazminogenu (ang.: recombinant tissue plasminogen activator, [rt-PA]; podawany dożylnie w dawce 10 mg/kg mc). Wyniki badań behawioralnych pokazały, że masytinib stosowany zarówno w monoterapii jak i w kombinacji z rt-PA zmniejsza nasilenie neurologicznych objawów udaru. Jednak niewskazane jest stosowanie tego inhibitora w wysokich dawkach ze względu na obserwowane w naszych badaniach działania niepożądane. Neuroprotekcyjne działanie masytinibu prawdopodobnie jest związane z ochroną bariery krew-mózg przed dezintegracją w obecności rt-PA. Jednak szczegółowe mechanizmy działania tej substancji w udarze są nieznane. Uzyskane przez nas wyniki uzasadniają dalsze badania nad potencjalnym zastosowaniem inhibitorów kinaz tyrozynowaych w terapii udaru niedokrwiennego mózgu.

Wyniki badań opublikowano:

- Kocić I., Kowianski P., Rusiecka I., **Lietzau G.**, Mansfield C., Moussy A., Hermine O., Dubreuil P. (2015) Neuroprotective effect of masitinib in rats with postischemic stroke. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,* vol. 388(1):79-86; DOI: 10.1007/s00210-014-1061-6 (IF 2,376; MEiN 25)

Mój wkład w badania nad udarem mózgu został doceniony w 2016 roku, gdy wraz z pozostałymi członkami zespołu, zostałam laureatką ***nagrody zespołowej II-stopnia*** przyznanej przez Rektora GUMed za badania nad poprawą skuteczności terapii fibrynolitycznej w doświadczalnym udarze mózgu.

III. Rola układu żylnego w ośrodkowym układzie nerwowym oraz regulacja mózgowego przepływu krwi w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych

Okazją do poszerzenia wiedzy na temat układu naczyniowego mózgowia, z którym związana była tematyka mojej rozprawy doktorskiej, stał się dla mnie udział w przygotowaniu 2 prac poglądowych. Pierwsza z prac dotyczy budowy i roli układu żylnego w OUN. Pomimo, iż naczynia żylne stanowią 45% układu naczyniowego mózgowia nadal są one najsłabiej poznaną jego częścią. W pracy przedstawiono obowiązujące podziały morfologiczne i funkcjonalne układu żylnego mózgowia oraz jego charakterystykę w różnych jego obszarach, podkreślono istotną rolę zespoleń naczyniowych w układzie żylnym oraz jego rolę w autoregulacji mózgowego przepływu krwi, a także udział w przebiegu wybranych procesów patologicznych (powstawanie malformacji

naczyniowych, rozwój chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych). Należy założyć, iż rola układu żylnego w regulacji przepływu krwi oraz procesach patologicznych w OUN jest znacznie większa niż do tej pory sądzono.

Druga publikacja przedstawia podsumowanie aktualnych poglądów na temat morfologicznych i czynnościowych podstaw regulacji mózgowego przepływu krwi. Temat ten jest istotny z uwagi na fakt, iż choroby naczyniowe OUN stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów i najczęstszych przyczyn niepełnosprawności we współczesnym świecie. W pracy omówione zostały układy naczyniowe mózgowia (tj. układ naczyń tętniczych, żylnych i włosowatych), unerwienie naczyń mózgowych, a także wpływ różnych czynników (metabolicznych, miogennych, neurogennych oraz fizycznych) na regulację mózgowego przepływu krwi. Dodatkowo, przedyskutowano konsekwencje zmian wynikających z nieprawidłowego funkcjonowania tych mechanizmów w warunkach patologicznych. Podkreślono również istotne znaczenie dla utrzymania prawidłowej wielkości przepływu mózgowego zintegrowanego współdziałania struktur tworzących tzw. jednostkę nerwowo-naczyniową (ang.: neurovascular unit, [NVU]) tj. neuronów, neurogleju oraz elementów ściany naczyniowej. W konsekwencji, regulacja mózgowego przepływu krwi jest złożonym procesem, na który ma wpływ wiele czynników począwszy od elementów morfologicznych tkanki nerwowej, a skończywszy na czynnikach metabolicznych, miogennych, fizycznych i neurogennych, których ścisłe współdziałanie decyduje o jego ostatecznym kształcie.

Prace poglądowe:

- Kowiański P., **Lietzau G.**, Moryś J. (2010) Budowa i funkcje układu żylnego w ośrodkowym układzie nerwowym. *Interdisciplinary problems of stroke,* vol. 12(1-2):36-41 (MEiN 2)
- Kowiański P., **Lietzau G.**, Karwacki Z., Steliga A., Moryś J. (2013) Uwarunkowania morfologiczne i czynnościowe regulacji mózgowego przepływu krwi. *Forum Medycyny Rodzinnej*, vol. 7(6):59-70 (MEiN 4)

IV. Wpływ stresu na układ limbiczny w trakcie starzenia się

Inny projekt, w który byłam zaangażowana w trakcie pracy w GUMed dotyczył zmian w układzie limbicznym wywołanych przez ostry i przewlekły stres o umiarkowanym nasileniu u osobników w różnym wieku. Badania były prowadzone pod kierunkiem dr Ewy Badowskiej-Szalewskiej. Do indukcji stresu o charakterze ostrym i przewlekłym u 1-miesięcznych (P28) i 12-miesięcznych (P360) szczurów rasy Wistar wykorzystano dwa testy behawioralne: otwartego pola i wymuszonego pływania, które zastosowano w jednym z dwóch wariantów: 1) jeden raz, przez 15 min. (stres ostry) lub 2) 15 min. dziennie, przez 21 dni (stres przewlekły). Wykorzystując metodę IHC oraz mikroskopii konfokalnej, badaliśmy wywołane stresem zmiany w zawartości interleukiny IL-1β w sektorach CA1, CA3 oraz zakręcie zębatym hipokampa, a także przyśrodkowej (CeA) i centralnej (MeA) części ciała migdałowatego. Wyniki pokazały, że zarówno w grupie kontrolnej (zwierzęta w tym samym wieku, nie biorące udziału w testach behawioralnych), jak i po zastosowaniu bodźców stresowych, we wszystkich badanych obszarach OUN, większa liczba komórek IL-1β+ była obecna w osobników P360 w porównaniu z P28. Ekspozycja zarówno na ostry jak i przewlekły stres szczurów z grupy P28 nie miała wpływu na gęstość immunoreaktywnych komórek w CeA. W tej grupie wiekowej odnotowaliśmy natomiast umiarkowany wzrost IL-1β+ komórek w MeA, CA1, CA3 i zakręcie zębatym hipokampa. W żadnym z badanych rejonów mózgowia, nie zaobserwowaliśmy istotnych różnic w gęstości komórek IL-1β+ w zależności od rodzaju zastosowanego bodźca stresowego i częstotliwości jego stosowania (stres ostry i przewlekły). W grupie P360, w żadnym z badanych rejonów mózgowia

nie wykryliśmy istotnych zmian w liczbie komórek IL-1β+ w porównaniu z grupą kontrolną. Brak było również różnic w zawartości tej cytokiny prozapalnej w badanych strukturach układu limbicznego między grupami doświadczalnymi, w których zastosowano różne bodźce stresowe czy rodzaje stresu. Podsumowując, wraz z wiekiem liczba komórek zawierających IL-1β wzrasta w hipokampie i ciele migdałowatym, a stres (zarówno ostry jak i przewlekły) wpływa na poziom tej cytokiny w układzie limbicznym tylko u osobników młodych.

Dalsze badania przy użyciu techniki Western blot wykazały, że poziom białka IL-1β w hipokampie u osobników z grupy kontrolnej nie zmienia się wraz z wiekiem, wzrasta natomiast liczba komórek NeuN/IL-1β+ w grupie wiekowej P360 w porównaniu z P28. Przewlekły stres wywołał wzrost ekspresji IL-1β w hipokampie osobników z obu grup wiekowych, ale liczba neuronów zawierających tę cytokinę wzrosła jedynie w grupie P360. Fakt ten sugeruje, że u osobników młodych stres wywołuje wzrost ekspresji tej cytokiny prozapalnej również w innych niż neurony populacjach komórek. Większa liczba neuronów zawierających IL-1β może wskazywać na ważną rolę tych komórek w modulacji aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza u starzejących się osobników poddanych przewlekłemu stresowi.

Przedstawione wyniki badań opublikowano w pracach:

- Badowska-Szalewska E., Klejbor I., Sidor-Kaczmarek J., Cecot T., **Lietzau G**., Spodnik J.H., Moryś J. (2009) Stress-induced changes of interleukin-1β within the limbic system in the rat. *Folia morphologica,* vol. 68(3):119-128 (MEiN 9)
- Badowska-Szalewska E., Ludkiewicz B., Sidor-Kaczmarek J., **Lietzau G.**, Spodnik J.H., Świetlik D., Domaradzka-Pytel B., Moryś J. (2013) Hippocampal interleukin-1β in the juvenile and middle-aged rat: response to chronic forced swim or high-light open-field stress stimulation. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, vol. 73:364-378 (IF 2,244; MEiN 15)

Tematykę wpływu, powszechnie występujących w środowisku naturalnym, bodźców stresowych o umiarkowanym natężeniu na ekspresję neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang.: brain-derived neurotrophic factor, [BDNF]) w różnych stadiach ontogenezy podsumowaliśmy w opublikowanej ostatnio pracy poglądowej:

- Badowska-Szalewska E., **Lietzau G.**, Moryś J., Kowiański P. (2021) Role of brain-derived neurotrophic factor in shaping the behavioural response to environmental stressors. *Folia morphologica*. Aug 19; 80(3):487-50; DOI: 10.5603/FM.a2021.0079 (IF 1,183; MEiN 70)

BDNF bierze udział w integracji aktywności mózgowej, której towarzyszy kształtowanie krótko- i długoterminowej neuroplastyczności strukturalnej i funkcjonalnej w OUN. Jedną z funkcji tego czynnika neurotroficznego jest kształtowanie odpowiedzi na bodźce stresowe w postaci precyzyjnie regulowanych reakcji behawioralnych z udziałem układu limbicznego i wewnątrzwydzielniczego, którym towarzyszy wzbudzenie osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. W pracy przedstawiono wpływ różnych czynników stresowych na poziom ekspresji BDNF w kolejnych fazach rozwoju osobniczego. Wpływ ten zależy między innymi od rodzaju i czasu działania stresora, odporności na stres, momentu detekcji, obszaru mózgu, a także genotypu osobniczego. Lepsze zrozumienie mechanizmów kształtujących reakcje stresowe, łącznie z rolą BDNF, może przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych strategii zapobiegania i leczenia stresu oraz chorób z nim związanych.

V. Neuroplastyczność, jej mechanizmy w strukturach korowo-zależnych i układzie nagrody, oraz wpływ uzależniających substancji psychoaktywnych

Tematyką która mnie zainteresowała w pierwszych latach mojej pracy w GUMed, a badania w jej zakresie prowadzę do tej pory, są procesy neuroplastyczności. Jedną ze struktur, w której odgrywają one ważną rolę jest przedmurze. Jest to jedna z mniej poznanych struktur w OUN. Wyniki opublikowanych ostatnio badań sugerują, że ta cienka (1-2mm) warstwa istoty szarej, leżąca miedzy torebką ostatnią a torebką zewnętrzną mózgu na granicy kory nowej (*neocortex*) i kory dawnej (*allocortex*), bierze udział w funkcjonowaniu świadomości człowieka [103]. Badania nad ultrastrukturą synaptyczną przedmurza oraz połączeniami między nim a korą mózgu w ramach tzw. przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej prowadził m.in. poprzedni kierownik Zakładu Anatomii i Neurobiologii GUMed prof. dr hab. n. med. Olgierd Narkiewicz.

Celem projektu, w którym brałam udział była charakterystyka GABA-ergicznych interneuronów hamujących w przedmurzu szczura w pierwszych 4 miesiącach życia. Informacje na temat współwystępowania w trakcie rozwoju określonych markerów takich jak neuropetyd Y (NPY), somatostatyna (SOM), wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), a także białek wiążących wapń: kalbindyny (CB), kalretyniny (CR) czy parwalbuminy (PV) w tej populacji komórek mogą rzucić światło na ich pochodzenie i funkcję pełnioną w tym rejonie mózgu. Analiza podwójnie wybarwionych komórek przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazała kolokalizację w neuronach przedmurza: VIP i CR (bezpośrednio po urodzeniu), a także NPY i CB, CR i PV, SOM i CB (w pozostałych grupach wiekowych). Uzyskane wyniki świadczą o zróżnicowaniu populacji interneuronów GABA-ergicznych w przedmurzu pod względem występowania neuropeptydów i białek wiążących wapń.
Kontynuacją badań prowadzonych w układzie limbicznym był projekt, którego jednym z założeń była ocena wpływu substancji psychoaktywnych: kofeiny i nikotyny (podawanych razem lub osobno) na aktywację neuronów w jądrze półleżącym (NAc), obszarze brzusznym nakrywki (VTA), ciele migdałowatym (Amg), hipokampie (Hip), przyśrodkowej części kory przedczołowej (mPfr), a także grzbietowej części prążkowia (CdP) u dorosłego szczura. Kofeinę i/lub nikotynę podawano zwierzętom (odpowiednio dootrzewnowo i podskórnie), przez 5 dni. Oceny aktywacji neuronów dokonano w oparciu o wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych: fosforylowanej formy białka CREB (ang.: cAMP response element-binding protein*)* i ΔFosB przy użyciu IHC. Po podaniu nikotyny największy wzrost gęstości komórek pCREB+ odnotowaliśmy w NAc. Po podaniu kofeiny najmniej komórek pCREB+ było w mPfr i CdP. Jednoczesne podanie obu psychostymulantów wywołało spadek gęstości neuronów zawierających ten czynnik transkrypcyjny w NAc oraz wzrost w Amg. Najwięcej neuronów ΔFosB+ zaobserwowaliśmy w Amg (po podaniu nikotyny) oraz w Hip (u zwierząt, które otrzymały kofeinę). Jednoczesna stymulacja kofeiną i nikotyną wywołała spadek liczby komórek ΔFosB+ w Amg i wzrost – w Hip. Podsumowując, aktywacja neuronów w układzie limbicznym zależy od typu działającego bodźca, obszaru mózgu, a także kontekstu funkcjonalnego. Aktywacja obu czynników transkrypcyjnych odpowiada za modyfikujące działanie kofeiny na zachowania związane z zażywaniem nikotyny, co należy wziąć pod uwagę przy rzucaniu palenia.

Przedstawione wyniki badań opublikowano:

- Kowiański P., Dziewiątkowski J., Moryś J.M., Majak K., Wójcik S., Edelstein L.R., **Lietzau G.**, Moryś J. (2009) Colocalization of neuropeptides with calcium-binding proteins in the claustral interneurons during postnatal development of the rat. *Brain research bulletin,* vol. 80(3):100-106; DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.06.020 (IF 2,184; MEiN 27)

- Kowiański P., **Lietzau G**, Steliga A., Czuba E., Ludkiewicz B., Waśkow M., Spodnik JH., Moryś J. (2018) Nicotine-induced CREB and DeltaFosB activity is modified by caffeine in the brain reward system of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Mar;88:1-12; DOI: 10.1016/j.jchemneu. 2017.10.005 (IF 2,357; MEiN 20)

Jednym z „regulatorów" plastyczności w OUN jest BDNF. Do kluczowych funkcji tego jednego z najpowszechniej występujących czynników neurotroficznych w mózgowiu ssaków zaliczyć należy udział w kontroli rozwoju neuronów i komórek glejowych, działanie neuroptotekcyjne, a także modulację krótko- i długotrwałych oddziaływań synaptycznych [104], które mają istotne znaczenie w procesach poznawczych i pamięci. Rolę aktywnych biologicznie izoform białka BDNF na różnych etapach rozwoju ontogenetycznego, w różnych populacjach komórek oraz przegląd aktywowanych przez nie szlaków sygnalizacyjnych w OUN w warunkach fizjologicznych i patologicznych przedstawiliśmy w pracy przeglądowej:

- Kowiański P., **Lietzau G**, Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. (2018) BDNF - a key factor of multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* Apr;38(3):579-593; DOI: 10.1007/s10571-017-0510-4 (IF 3,811; MEiN 20)

Publikacja ta cieszy się dużym zainteresowaniem (341 cytowań w dnia 8.02.2022) i jest oznaczona jako artykuł szeroko cytowany w bazie Web of Science.

Procesy neuroplastyczności stanowią również temat naszej ostatniej pracy poglądowej:

- Bayassi-Jakowicka M., **Lietzau G**, Czuba E., Steliga A., Waśkow M., Kowiański P. (2021) Neuroplasticity and Multilevel System of Connections Determine the Integrative Role of Nucleus Accumbens in the Brain Reward System. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(18):9806:1-39; DOI: 10.3390/ijms22189806; (IF 5,923; MEiN 140)

Zaliczane do układu nagrody jądro półleżące charakteryzuje wielopoziomowa organizacja, rozbudowane połączenia z innymi obszarami mózgowia i występowanie kilku systemów neuroprzekaźnikowych. Unikatowa rola jądra półleżącego w OUN wynika z obecności licznych połączeń z innymi rejonami mózgowia, dobrze rozwiniętej plastyczności morfologicznej i funkcjonalnej, która wpływa na regulację krótko- i długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz szlaków sygnalizacyjnych, współdziałania kilku systemów neuroprzekaźnikowych, a także wspierającej funkcji neurogleju. W publikacji umieściliśmy opracowany przez nas schemat przedstawiający uporządkowany model połączeń aferentnych i eferentnych jądra półleżącego z innymi obszarami mózgowia (rycina 2). Zrozumienie złożonej roli jądra półleżącego w układzie nagrody jest możliwe biorąc pod uwagę wyniki badań morfologicznych, molekularnych, genetycznych i behawioralnych. W pracy przedstawiono aktualne poglądy na funkcje pełnione przez jądro półleżące w warunkach fizjologicznych, omówiono znaczenie jego połączeń z innymi obszarami OUN, procesy neuroplastyczności, a także układy neuroprzekaźnikowe.

Za powyższą publikację, wraz z pozostałymi członkami zespołu, otrzymałam w 2021 roku ***Nagrodę Specjalną*** przyznaną przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

VI. Jednostka nerwowo-naczyniowa – jej struktura i funkcje w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych, a także jako potencjalne źródło biomarkerów udaru mózgu

Kolejnym tematem, który miałam okazję zgłębić była rola jednostki nerwowo-naczyniowej (NVU) w funkcjonowaniu mózgowia. W cyklu publikacji poglądowych podsumowaliśmy aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji NVU (w szczególności roli pełnionej przez astrocyty), jej

roli w metabolizmie cholesterolu w mózgowiu, a także możliwości jej wykorzystania jako źródło biomarkerów w udarze mózgu.

Pomimo intensywnych badań nad udziałem astrocytów w funkcjonowaniu NVU, nadal pozostaje kilka istotnych kwestii, które wymagają wyjaśnienia. Należą do nich: 1) modulatorowe działanie astrocytów na synapsy trójdzielne, 2) znaczenie, w warunkach fizjologicznych i patologicznych, reakcji zwężenia naczyń wywołanej przez metabolity kwasu arachidonowego, 3) związek pomiędzy poziomem aktywności mózgu a procesami metabolicznymi zachodzącymi w astrocytach, a także 4) rola astrocytów w odpowiedzi nerwowo-naczyniowej w warunkach patologicznych w OUN. Powyższe zagadnienia, oraz różne funkcje pełnione przez astrocyty w zależności od warunków panujących w OUN, przedyskutowano w pierwszej publikacji.

Kolejna publikacja przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli cholesterolu w funkcjonowaniu NVU w warunkach fizjologicznych i patologicznych. W pracy zaprezentowano badania, których wyniki sugerują iż zaburzenia homeostazy cholesterolu w OUN mogą mieć związek z insulinoopornością i rozwojem T2DM, angiopatią amyloidową, a także chorobami neurodegeneracyjnymi.

Ważną publikacją w moim dorobku naukowym jest praca poglądowa na temat możliwości wykorzystania elementów NVU jako źródła biomarkerów pozwalających na identyfikację różnych typów i faz udaru niedokrwiennego mózgu, które miałyby również wartość prognostyczną w odniesieniu do oceny śmiertelności czy powikłań związanych z udarem. W chwili obecnej diagnoza neurologiczna i neuroradiologiczna udaru mózgu, zwłaszcza w fazie ostrej, jest często niepewna lub nierozstrzygająca. W rezultacie często trudno jest zidentyfikować pacjentów źle rokujących lub obarczonych zwiększonym ryzykiem powikłań, a także tych którzy mogliby skorzystać z bardziej agresywnych form leczenia. Dlatego też istnieje pilna, uzasadniona potrzeba opracowania nowych metod diagnostycznych, które byłyby odpowiedzią na to zapotrzebowanie. W pracy dyskutujemy na temat perspektyw znalezienia biomarkerów, będących elementami NVU, charakterystycznych dla różnych typów i faz udaru, których stężenie w płynach ustrojowych będzie korelowało z rozległością uszkodzenia mózgowia oraz statusem neurologicznym pacjenta. Przedstawiamy również krytyczną analizę perspektyw dalszej poprawy diagnostyki udaru mózgu. Praca ta ma dla mnie szczególne znaczenie z uwagi na fakt, że opublikowano ją w jednym z najbardziej prestiżowych czasopism dotyczących problematyki chorób naczyniowych mózgu (*Translational Stroke Research*) i jestem w niej ostatnim autorem. W chwili obecnej, pomimo stosunkowo krótkiego czasu od daty publikacji, praca ma już 19 cytowań (dane wg Web of Science z dnia 8.02.2022).

Prace poglądowe:

- Kowiański P., **Lietzau G.**, Steliga A., Waśkow M., Moryś J. (2013) The astrocytic contribution to neurovascular coupling - Still more questions than answers? *Neuroscience Research,* vol. 75:171–183; DOI: 10.1016/j.neures.2013.01.014 (IF 2,145; MEiN 20)
- Czuba E., Steliga A, **Lietzau G**, Kowiański P. (2017) Cholesterol as a modifying agent of the neurovascular unit structure and function under physiological and pathological conditions. *Metabolic brain disease* Aug;32(4):935-948; DOI: 10.1007/s11011-017-0015-3 (IF 2,441; MEiN 25)
- Steliga A., Kowiański P., Czuba E., Waśkow M., Moryś J., **Lietzau G.** (2020) Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers-Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application. *Translational Stroke Research*, Aug 11(4):553-579; DOI: 10.1007/s12975-019-00744-5 (IF 6,829; MEiN 140)

Podsumowując, rezultatem mojej pracy badawczej w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym jest współautorstwo w 9 oryginalnych publikacjach naukowych i 10 pracach poglądowych o łącznej wartości wskaźnika IF 36,303 i pkt MEiN 634 (łączna liczba cytowań wg Web of Science wynosi 479, dane z dnia 8.02.2022). Wyniki badań zaprezentowano na 19 konferencjach krajowych i 1 zagranicznej (wyszczególnione w pkt. 7 *Wykazu osiągnięć naukowych*).

C) DEPARTMENT OF CLINICAL SCIENCE AND EDUCATION, KAROLINSKA INSTITUTET, SÖDERSJUKHUSET, SZTOKHOLM

W okresie 2014-2020 przebywałam na stażu podoktorskim w grupie badawczej prof. Thomasa Nyström'a i dr Cesare Patrone w Karolinska Institutet (KI), w Sztokholmie (*https://ki.se/en/kisos/the-neurocardiometabol-group*). Podczas mojego pobytu w tym prestiżowym instytucie badawczym zainicjowałam badania nad związkiem pomiędzy otyłością i cukrzycą typu 2 a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Jestem autorką lub współautorką koncepcji badań oraz uzyskałam finansowanie na realizację dotyczących tej tematyki projektów badawczych, których wyniki zostały opublikowane, a część z nich stanowi cykl 4 publikacji tworzący zaprezentowane wcześniej osiągnięcie naukowe (pkt. 4 *Autoreferatu*). Ponadto byłam beneficjentką lub brałam udział w realizacji 10 grantów: w 3 jako kierownik, w 7 jako wykonawca. Zestawienie tematyki projektów oraz szczegółowe informacje na temat fundatorów, okresu realizacji badań, a także wysokości kwot dofinansowania znajdują się w Tabeli 1.

Moje pozostałe zainteresowania naukowe dotyczyły takich tematów jak:

I. **Wpływ cukrzycy typu 2 oraz analogów GLP-1 na procesy neurogenezy i neuroplastyczności** (4 publikacje)
II. **Wpływ cukrzycy typu 2 na procesy naprawcze w udarze niedokrwiennym mózgu** (2 publikacje)
III. **Gliptyny – mechanizmy działania w ośrodkowym układzie nerwowym oraz ich zastosowanie w leczeniu chorób neurologicznych** (3 publikacje)

Opisany poniżej dorobek naukowy powstał przy **współpracy**, w ramach sieci naukowej grupy badawczej NeuroCardioMetabol, z następującymi ośrodkami naukowymi i firmami biomedycznymi:

- Department of Molecular Medicine and Surgery, KI, Szwecja (Prof. Claes-Göran Östenson)
- Department of Physiology and Pharmacology, KI; Pronexus Analytical AB, Szwecja (dr Jan Kehr)
- Department of Molecular Medicine and Surgery, KI, and Dept. of Research, Södertälje Hospital, Södertälje, Szwecja (Assoc. Prof. Camilla Krizhanovskii)
- The European Neuroscience Institute oraz KI, Szwecja (dr André Fisahn)
- Department of Physiology, Institute of Neuroscience and Physiology, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Szwecja (Prof. Carina Mallard)
- Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Chiny (dr Zhida Wang)
- Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugalia (dr Ana I. Duarte)
- Department of Drug Science and Technology, University of Turin, Włochy (Prof. Massimo Collino)
- Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Włochy (Assoc. Prof. Stefania Ceruti)
- Boehringer Ingelheim AB, Szwecja (dr Josefin Skogsberg)
- Boehringer Ingelheim AB, Niemcy (dr Thomas Clein)

- PXBioVision GmbH, Hannover, Niemcy (dr med. Harald Tammen)

Tabela 1. Finansowanie projektów badawczych realizowanych w Karolinska Institutet

Lp.	Tytuł grantu	Fundator [Nr grantu]	Okres finansowa-nia	Kwota (Euro)	Kierownik
1.	Pathogenic mechanisms at the basis of cognitive decline and dementia in diabetes: a translational project	Åhlén stiftelsen	2016	22,000	Cesare Patrone
2.	GLP-1R activation for the treatment of stroke	Konung Gustaf V:s och Drottning Victorias Frimurarestiftelse	2015-2017	30,000	Cesare Patrone
3.	Inkretinbaserade läkemedel för behandling av stroke	ALF (Swedish governmental research financing body) [20150568]	2016-2017	30,000	Thomas Nyström
4.	Inkretinbaserad läkemedelsbehandling mot hjärtsjukdom och stroke	ALF (Swedish governmental research financing body) [20160477]	2017-2018	30,000	Thomas Nyström
5.	Inkretinbaserad läkemedelsbehandling mot kardiovaskulär sjukdom	Hjärt-Lungfonden	2016-2019	150,000	Thomas Nyström
6.	Stroke recovery in diabetes: mechanisms and therapies based on glucagon-like peptide 1 receptor activation	European Foundation for the Study of Diabetes (Düsseldorf)	2018-2020	90,000	Cesare Patrone
7.	Stroke recovery in diabetes: mechanisms and therapies based on glucagon-like peptide receptor 1 activation	Swedish Research Council [2018-02483_VR]	2019-2021	235,000	Cesare Patrone
8.	Olfactory dysfunction in type 2 diabetes – the first step towards cognitive decline?	Stiftelsen för Gamla Tjänarinnor	2018-2019	3,000	**Grażyna Lietzau**
9.	Stroke recovery in diabetes: mechanisms and therapies based on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors	AstraZeneca och Svensk Förening för Diabetologi	2019	5,000	**Grażyna Lietzau**
10.	The effects of diabetes and obesity on the olfactory system – an important link to cognitive decline?	KI Stiftelser & Fonden	2018-2020	20,000	**Grażyna Lietzau**

I. Wpływ cukrzycy typu 2 oraz analogów GLP-1 na procesy neurogenezy i neuroplastyczności

Jednym z częstych skutków ubocznych niektórych terapii obniżających poziom glukozy u pacjentów z T2DM jest hipoglikemia [105], która może prowadzić między innymi do zaburzeń poznawczych, otępienia i AD [106, 107]. O ile znany jest wpływ hipoglikemii na neurony, o tyle nadal nie wyjaśnione są skutki jej działania na neuronalne komórki macierzyste (ang.: neural stem cells, [NSCs]). Celem naszych badań było stworzenie modelu *in vitro* przydatnego do badania wpływu hipoglikemii na NSCs. Chcieliśmy także określić czy polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylowaną (ang.: pituitary adenylate cyclase-activating peptide, [PACAP]) i analog GLP-1 eksendyna-4 (ang.: exendin-4, [Ex-4]) mogą zapobiec skutkom hipoglikemii we wspomnianej populacji komórek. Wykazaliśmy, że PACAP działając poprzez receptor PAC-1 oraz dzięki aktywacji kinazy białkowej A zapobiega wywołanej przez hipoglikemię redukcji przeżywalności NSCs. Działania tego nie odnotowaliśmy w przypadku Ex-4. Uzyskane wyniki sugerują potencjalną rolę terapeutyczną agonistów receptora PAC-1 w leczeniu powikłań neurologicznych wywołanych przez upośledzenie neurogenezy wskutek hipoglikemii.

Kolejny projekt, w który byłam zaangażowana dotyczył wpływu T2DM na struktury mózgowia związane z funkcjami poznawczymi, czuciowymi i ruchowymi. Wyniki ostatnio opublikowanych badań wykazały, że upośledzenie funkcji hamujących interneuronów GABA-ergicznych ma związek z zaburzeniami funkcji poznawczych w trakcie starzenia się [108]. Przyjęliśmy hipotezę, że podobne zaburzenia wcześniej wywołuje T2DM w korze nowej i prążkowiu, czyli rejonach mózgowia odpowiedzialnych między innymi za funkcje poznawcze i czuciowo-ruchowe. Interesowało nas również to czy skutkom T2DM można zapobiec stosując analog GLP-1 Ex-4. W warunkach doświadczalnych wykazaliśmy, że T2DM wywołuje zmniejszenie gęstości interneuronów GAD-67+ w prążkowiu oraz interneuronów CB+ zarówno w prążkowiu, jak i korze nowej, a także zwiększenie średniej objętości interneuronów PV+ w przebiegu starzenia. Dalszych badań wymaga odpowiedź na pytanie czy zidentyfikowane przez nas mechanizmy patofizjologiczne leżą u podstaw zwiększonej częstości występowania zaburzeń funkcji poznawczych u osób z T2DM. U szczurów z T2DM, skutkiem podawania Ex-4 było zwiększenie gęstości interneuronów CB+ w prążkowiu. Wykryte przez nas pozytywne działanie Ex-4 na subpopulację interneuronów CB+ sugeruje potencjał terapeutyczny analogów GLP-1 u pacjentów z T2DM, u których występują powikłania neurologiczne.

Kontynuacją poprzedniego tematu były badania nad związkiem T2DM z występowaniem zaburzeń poznawczych, otępienia, a także AD. Procesy poznawcze i formowanie pamięci są związane z występowaniem oscylacji gamma wytwarzanych w sieciach neuronowych hipokampa, a szybko reagujące na pobudzenie neurony wstawkowe (ang.: fast-spiking interneurons) zawierające parwalbuminę (PV) odgrywają kluczową rolę w tych procesach. Badaliśmy wpływ T2DM na oscylacje gamma oraz morfologię i gęstość interneuronów PV+ u 6-cio miesięcznych szczurów rasy Goto-Kakizaki (GK, genetyczny model spontanicznie rozwijającej się T2DM) w porównaniu ze szczurami Wistar w tym samym wieku. W badaniach elektrofizjologicznych wykazaliśmy, że T2DM zaburza oscylacje gamma w obrębie sieci neuronowej hipokampa u szczurów GK, czemu towarzyszy zwiększenie gęstości interneuronów PV+ w tym obszarze mózgowia, a także aktywacja markerów stresu metabolicznego w tych komórkach. Wykryte przez nas zaburzenia oscylacji gamma oraz funkcjonowania subpopulacji GABA-ergicznych interneuronów PV+ w hipokampie mogą leżeć u podstaw zaburzeń poznawczych w T2DM.

Kolejnym obszarem OUN, w którym badaliśmy zmiany wywołane przez T2DM jest jądro pasma samotnego. Znajdują się w nim komórki syntetyzujące GLP-1. Wcześniej udowodniono, że peptyd ten nie tylko reguluje metabolizm, ale ma również pozytywny wpływ na procesy poznawcze oraz działanie neuroprotekcyjne [109]. Do tej pory stosunkowo dobrze scharakteryzowano komórki produkujące GLP-1 znajdujące się w jelitach, jednak wiedza na temat syntetyzujących go neuronów w OUN nadal jest stosunkowo niewielka. W projekcie wykorzystaliśmy model otyłości/T2DM wywołany długotrwałym przyjmowaniem diety bogatej w tłuszcze (HFD) podawanej myszom przez 12 miesięcy. Model ten wykorzystano do zbadania wpływu T2DM na liczbę, potencjalną atrofię, oraz aktywację neuronów GLP-1+ w OUN. Drugim celem było określenie wpływu terapii normalizujących poziom glikemii z zastosowaniem linagliptyny lub glimepiridu, podawanych przez 3 miesiące, na potencjalne zmiany w komórkach GLP-1+ w mysim modelu T2DM. Uzyskane wyniki nie wykazały istotnych zmian parametrów morfologicznych komórek GLP-1+. U myszy z T2DM zaobserwowaliśmy natomiast zwiększoną aktywację neuronów GLP-1+, czemu towarzyszył proces zapalny. Oba zastosowane leki przeciwcukrzycowe częściowo normalizowały ten efekt oraz zmniejszyły natężenie procesu zapalnego. Sądzimy, że zwiększona aktywacja komórek GLP-1+ może odzwierciedlać nieprawidłowe zapotrzebowanie metaboliczne towarzyszące otyłości/T2DM, które łagodzi normalizacja poziomu glikemii. To czy zwiększenie aktywności neuronów GLP-1+ w jądrze pasma samotnego poprzedza upośledzenie sygnalizacji z udziałem GLP-1 w OUN wymaga dalszych badań.

Wyniki wyżej opisanych badań opublikowano:

- Mansouri S., **Lietzau G.**, Lundberg M., Nathanson D., Nyström T., Patrone C. (2016) Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide Protects Adult Neural Stem Cells from a Hypoglycaemic milieu. *PLoS One*, Jun 15;11(6); DOI: 10.1371/journal.pone.0156867 (IF 2,806; MEiN 35)
- Larsson M., **Lietzau G.**, Nathanson D., Östenson C.G., Mallard C., Johansson M.E., Nyström T., Patrone C., Darsalia V. (2016) Diabetes negatively affects cortical and striatal GABAergic neurons: an effect that is partially counteracted by exendin-4. *Bioscience Reports*, Dec 5;36(6); DOI: 10.1042/BSR20160437 (IF 2,906; MEiN 20)
- **Lietzau G.**, Darsalia V., Pintana H., Östenson C.G., Nyström T., Fisahn A., Patrone C. (2017) Type 2 diabetes alters hippocampal gamma oscillations: a potential mechanism behind impaired cognition *Psychoneuroendocrinology* Apr 27;82:46-50; DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.04.012 (IF 4,731; MEiN 40)
- **Lietzau G.**, Ntika S., Pintana H., Tracy L., Klein T., Nyström T., Darsalia V., Patrone C., Krizhanovskii C. (2021) A high-fat diet increases activation of the glucagon-like peptide-1-producing neurons in the nucleus tractus solitarii; an effect that is partially reversed by drugs normalizing glycaemia. *Cellular and Molecular Neurobiology*; Apr 3. DOI: 10.1007/s10571021-01079-2 (IF 5,046; MEiN 100)

II. Wpływ cukrzycy typu 2 na procesy naprawcze w udarze niedokrwiennym mózgu

Podczas pobytu w KI kontynuowałam również badania doświadczalne nad udarem niedokrwiennym mózgu. Dotyczyły one procesów naprawczych w jego fazie przewlekłej (do 6 tygodni po MCAO). Dodatkowo, ponieważ udar mózgu występuje przeważnie u osób w średnim i starszym wieku, a cukrzyca jest jednym z czynników ryzyka jego wystąpienia, zastosowany w tych badaniach model doświadczalny to myszy C57bl/6j w wieku 12-14 miesięcy, u których rozwinęła się otyłość/T2DM na skutek przyjmowania diety bogatej w tłuszcze (HFD). W modelu przejściowego MCAO (30 min.) badaliśmy wpływ otyłości/T2DM na procesy naprawcze w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu. Próbowaliśmy znaleźć odpowiedź na pytanie w jaki sposób otyłość/T2DM wpływa na aktywowane w przebiegu udaru procesy neurogenezy oraz neuroplastyczności z udziałem neuronów wstawkowych zawierających parwalbuminę (PV). Wyniki naszych badań dowiodły, że otyłość/T2DM upośledza funkcje mózgowia, ale nie

towarzyszą temu zmiany wielkości samego uszkodzenia. Ponadto u myszy z T2DM zaobserwowaliśmy zmniejszoną proliferację NSCs i formowanie neuroblastów w prążkowiu i hipokampie 2 tygodnie po MCAO oraz całkowite zahamowanie neurogenezy w hipokampie 6 tygodni po reperfuzji. Dodatkowo, 2 tygodnie po MCAO odnotowaliśmy atrofię interneuronów PV+ w prążkowiu myszy zarówno z T2DM, jak i bez cukrzycy. Jednakże po 6 tygodniach od wywołania MCAO efekt ten był obecny jedynie u myszy z T2DM. Odkryte przez nas zmniejszenie efektywności procesu neurogenezy i utrzymująca się atrofia interneuronów PV+, świadcząca o upośledzeniu procesów neuroplastyczności, poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów naprawczych po udarze niedokrwiennym mózgu w T2DM. Może ona okazać się użyteczna w opracowaniu nowych strategii rehabilitacji dla pacjentów z T2DM po udarze mózgu.

Kontynuacją poprzedniego tematu badawczego był projekt, którego celem było określenie jak T2DM wpływa na liczebność neuronów wstawkowych zawierających somatostatynę (SOM) w obszarze zawału i strefie okołozawałowej w 2. i 6. tygodniu po MCAO. W tym celu zaproponowaliśmy nową metodę oceny ilościowej, która niweluje różnice w uszkodzonej półkuli wynikające z deformacji tkanki oraz nieregularnej dystrybucji komórek po udarze mózgu. Po 6 tygodniach od MCAO zaobserwowaliśmy wzrost gęstości komórek SOM+ w prążkowiu myszy karmionych standardową dietą (grupy kontrolnej) w obrębie obszaru zawału oraz strefy okołozawałowej w porównaniu z prążkowiem drugiej półkuli. Wykazaliśmy, że wzrost ten nie był wynikiem neurogenezy. T2DM całkowicie zniosła obserwowany efekt w obszarze zawału niedokrwiennego. Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że obserwowany w fazie przewlekłej udaru mózgu wzrost ekspresji SOM w prążkowiu może mieć związek z zachodzącymi tu procesami naprawczymi, a T2DM hamuje ten proces.

Wyniki wyżej opisanych badań opublikowano:

- Pintana H., **Lietzau G.**, Augestad IL., Chiazza F., Nyström T., Patrone C., Darsalia V. (2019) Obesity-induced type 2 diabetes impairs neurological recovery after stroke in correlation with decreased neurogenesis and persistent atrophy of parvalbumin-positive interneurons. *Clinical Science (London, England: 1979)*; Jul 1;133(13):1367-1386; DOI: 10.1042/CS20190180 (IF 5,223; MEiN 140)
- Chiazza F., Pintana H., **Lietzau G.**, Nyström T., Patrone C., Darsalia V. (2021) The Stroke-Induced Increase of Somatostatin-Expressing Neurons is Inhibited by Diabetes: A Potential Mechanism at the Basis of Impaired Stroke Recovery. *Cellular and Molecular Neurobiology*; Apr;41(3):591-603; DOI: 10.1007/s10571-020-00874-7 (IF 5,046; MEiN 100)

III. Gliptyny – mechanizmy działania w ośrodkowym układzie nerwowym oraz ich zastosowanie w leczeniu chorób neurologicznych

Działanie inhibitorów DPP-4 (gliptyn) wykorzystywanych w leczeniu hiperglikemii u pacjentów z T2DM opiera się głównie na hamowaniu degradacji GLP-1, hormonu inkretynowego stymulującego wydzielanie insuliny po posiłku. Wyniki badań doświadczalnych wykazały neuroprotekcyjne działanie gliptyn w udarze niedokrwiennym mózgu, gdy zwierzęta otrzymywały je 4 tygodnie przed i 3 tygodnie po MCAO [90]. Dotychczas brak było danych na temat czy z podobnym efektem mielibyśmy do czynienia w przypadku rozpoczęcia ich podawania w ostrej fazie udaru oraz czy neuroprotekcja z udziałem gliptyn odbywa się poprzez aktywację receptora GLP-1. W celu uzyskania odpowiedzi na te pytania, myszy glp-1r(-/-) oraz myszy typu dzikiego poddaliśmy procedurze MCAO. Linagliptynę podawano w dwóch kombinacjach: w momencie zamykania tętnicy środkowej mózgu (w dawce 50mg/kg, dożylnie) lub przewlekle (w dawce 10 mg/kg, doustnie), przez 4 tygodnie przed i 3 tygodnie po MCAO. Neuroprotekcję oceniano na podstawie pomiaru objętości ogniska niedokrwiennego oraz oceny ilościowej NeuN+ neuronów w

uszkodzonej półkuli. Stwierdziliśmy, że wywołana przez linagliptynę neuroprotekcja w udarze mózgu wymaga przewlekłego jej podawania przed udarem i nie zachodzi z udziałem GLP-1R. Uzyskane wyniki uzupełniły wiedzę dotyczącą potencjalnego zastosowania klinicznego gliptyn w terapii udaru mózgu, jak również istotnie przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmów ich działania w OUN.

Brak danych na temat mechanizmów działania gliptyn w OUN, a także wykazanie w naszych poprzednich badaniach ich neuroprotekcyjnego działania niezależnego od GLP-1 po udarze mózgu, skłoniły nas do kontynuacji badań. Celem kolejnego projektu była próba odpowiedzi na pytanie czy w procesach naprawczych wywołanych przez inhibitor DPP-4 linagliptynę bierze udział szlak SDF-1α/CXCR4, a także identyfikacja dodatkowych czynników efektorowych. Czynnik pochodzenia stromalnego-1α (ang.: stromal cell-derived factor-1α, [SDF-1α]) jest substratem DPP-4, a wyniki badań wykazały, że agoniści receptora chemokinowego CXCR4 mają korzystne działanie w uszkodzeniach OUN [110]. Jednak udział SDF-1α w neuroprotekcji po udarze mózgu związanej z działaniem gliptyn nie był dotychczas badany. Wykazaliśmy, że zastosowanie linagliptyny prowadzi do wzrostu stężenia SDF-1α w OUN. Co ciekawe, efekt ten nie dotyczył GLP-1 i GIP. Zablokowanie szlaku SDF-1α/CXCR4, przy użyciu agonisty CXCR4: AMD3100, zahamowało poprawę funkcji neurologicznych i zmniejszenie wielkości obszaru niedokrwiennego u myszy otrzymujących linagliptynę. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęliśmy wniosek, że szlak SDF-1α/CXCR4 odgrywa istotną rolę w mechanizmie poprawy czynnościowej i ograniczenia skutków udaru mózgu związanej z zastosowaniem linagliptyny. Wyniki naszych badań sugerują występowanie mechanizmu neuroprotekcyjnego z udziałem szlaku SDF-1α/CXCR4, działającego w oparciu o regulację homeostazy Ca^{2+} oraz zmniejszenie aktywności kalpainy.

Wyniki naszych badań opublikowano:

- Darsalia V., Larsson M., **Lietzau G.**, Nathanson D., Nystrom T., Klein T., Patrone C. (2016) Gliptins-mediated neuroprotection against stroke requires chronic pre-treatment and is GLP-1R-independent. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, May;18(5):53741; DOI: 10.1111/dom.12641 (IF 6,715; MEiN 40)
- Chiazza F., Tammen H., Pintana H., **Lietzau G.**, Collino M., Nyström T., Klein T., Darsalia V., Patrone C. (2018) The effect of DPP-4 inhibition to improve functional outcome after stroke is mediated by the SDF-1α/CXCR4 pathway. *Cardiovascular Diabetology*; May 19;17(1):60; DOI: 10.1186/s12933-018-0702-3 (IF 5,948; MEiN 35)

Realizacja części opisanych wyżej zadań badawczych była możliwa dzięki sfinansowaniu projektu pt.: *"Stroke recovery in diabetes: mechanisms and therapies based on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors"* w ramach prestiżowego stypendium, które zostało mi przyznane w 2018 roku przez Szwedzkie Stowarzyszenie Diabetologii i Astra Zeneca (*http://svenskdiabetes.se/stipendier/*).

Zagadnienie wykorzystania gliptyn w leczeniu chorób neurologicznych podsumowaliśmy w pracy poglądowej:

- Darsalia V., Johansen OE., **Lietzau G.**, Nyström T., Klein T., Patrone C. (2019) Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for the Potential Treatment of Brain Disorders; A Mini-Review With Special Focus on Linagliptin and Stroke. *Frontiers in Neurology*, May 8;10:493; DOI: 10.3389/fneur.2019.00493; IF 2.889

Jak wcześniej wspomniano, gliptyny są lekami przeciwcukrzycowymi, a skutkiem ich działania jest redukcja hiperglikemii w przebiegu T2DM. Ponadto wykazano ich plejotropowe działanie w OUN. Korzystne działanie inhibitorów DPP-4 udowodniono w badaniach z wykorzystaniem

zwierzęcych modeli udaru mózgu [90, 111], PD [88, 112], oraz AD [113, 114]. W niektórych przypadkach dane przedkliniczne zostały poparte wynikami badań klinicznych. Jednak do tej pory mechanizmy dziania linagliptyny i innych substancji zaliczanych do inhibitorów DPP-4 w OUN zostały jedynie częściowo poznane, a ponadto, co wykazały wyniki naszych badań, są niezależne od GLP-1R. W pracy poglądowej podsumowaliśmy wyniki badań doświadczalnych i klinicznych dotyczących działania linagliptyny w OUN, ze szczególnym uwzględnieniem neuroprotekcji, działania prewencyjnego, a także wpływu na procesy naprawcze po udarze niedokrwiennym mózgu. Skupiliśmy się na roli omawianej grupy leków w udarze mózgu, co ściśle koresponduje z tematyką omówionych wcześniej prac badawczych naszego zespołu. Poza tym, pomimo działań prewencyjnych obejmujących takie czynniki ryzyka jak cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze, udar niedokrwienny mózgu nadal pozostaje jedną z wiodących przyczyn zgonów i trwałej niepełnosprawności osób w podeszłym wieku. Wyniki badań epidemiologicznych pokazują, że około 30% pacjentów po udarze mózgu nie wraca do pełnej sprawności i wymaga stałej opieki [115]. To uzasadnia potrzebę opracowania bardziej skutecznych strategii terapeutycznych w przewlekłej fazie udaru mózgu. Gliptyny są jednym z kandydatów do realizacji tego zadania, ale mechanizmy ich działania w OUN wymagają wyjaśnienia w toku dalszych badań.

Podsumowując, mój dorobek naukowy w trakcie pobytu w KI obejmuje: 12 oryginalnych prac naukowych, 1 pracę poglądową (jestem pierwszym autorem w 6 z nich i autorem korespondencyjnym – w 5), a także 2 artykuły w czasopiśmie branżowym dla lekarzy (w języku szwedzkim). Łączna wartość wskaźnika IF to 61.452, pkt. MEiN 860 (liczba cytowań wg Web of Science wynosi 166, dane z dnia 8.02.2022). Wyniki wyżej opisanych badań zaprezentowano na 23 konferencjach i sympozjach międzynarodowych (wyszczególnione w pkt. 7 *Wykazu osiągnięć naukowych*).

Szczególnie istotna, z mojego punktu widzenia, była możliwość zaprezentowania wyników badań w formie wystąpień ustnych na zjazdach i konferencjach naukowych:

- **Lietzau G.**, Darsalia V., Östenson C.-G., Nyström T., Patrone C. *GLP-1R activation by exendin-4 prevents neuronal loss in the piriform cortex of type 2 diabetic rats*, 51st EASD Annual Meeting, Stockholm, Szwecja, 14-18 wrzesień, 2015; Wystąpienie zarejestrowano: *http://www.easdvirtual meeting.org/users/31800*
- **Lietzau G.**, Darsalia V., Östenson C.-G., Nyström T., Patrone C. *Type 2 diabetes-induced neuronal pathology in the piriform cortex of the rat is reversed by the glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4.* 9th International Symposium on Neuroprotection Neurorepair, Lipsk, Niemcy, 19-22 kwiecień, 2016
- **Lietzau G.**, Candeias E., Magni G., Nyström T., Abbracchio M. P., Klein T., Ceruti S., Darsalia V., Patrone C. *The dipeptydyl peptidase 4 inhibitor linagliptin partially reverses diabetic-induced effects on neurons and age-induced effects on glial cells in the mouse striatum*, More than neurons: toward a less neuronocentric view of brain disorders, Turyn, Włochy, 1-3 grudzień, 2016
- **Lietzau G.**, Davidsson W., Östenson C. G., Nathanson D., Pintana H., Skoksberg J., Klein T., Nyström T., Darsalia V., Cesare P. *Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by DPP-4 inhibition*, More than Neurons: toward a less neuronocentric view of brain disorders: II edition, Turyn, Włochy, 29 listopad – 1 grudzień, 2018
- **Lietzau G.**, Davidsson W., Östenson C. G., Nathanson D., Pintana H., Skogsberg J., Klein T., Nyström T., Darsalia V., Patrone C. *Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity: effects partly reversed by DPP-4 inhibition*, 8th SRP Diabetes Retreat, Saltsjöbaden, Szwecja, 17-18 maj, 2018

W 2016 roku zainicjowałam nawiązanie współpracy z prof. Henrikiem Driudem, ekspertem z zakresu medycyny sądowej z Department of Oncology-Pathology w KI, w zakresie pobierania i gromadzenia materiału biologicznego *post-mortem* (w postaci struktur OUN) od zmarłych dawców z T2DM. Byłam odpowiedzialna za odbiór, transport, dokumentację i przechowywanie zgromadzonego materiału. Projekt jest w trakcie realizacji.

Opieka naukowa nad studentami:

- Główny opiekun naukowy i promotor pracy magisterskiej (2015, 2016), Karolinska Institutet, 2 studentów (Tabela 2, pkt. 1 i 2)
- Główny opiekun naukowy i promotor pracy licencjackiej (2017, 2018), Karolinska Institutet, 2 studentów (Tabela 2, pkt. 5 i 8)
- Główny opiekun naukowy (2018), Karolinska Institutet, 2 słuchaczy studiów magisterskich (Tabela 2, pkt. 9 i 10)
- Opiekun naukowy w czasie wizyty w ramach współpracy naukowej z Karolinska Institutet (2015-2016), 1 doktorant z Uniwersytetu w Coimbrze, Portugalia (Tabela 2, pkt. 3)
- Opiekun naukowy w czasie wizyty w ramach współpracy naukowej z Karolinska Institutet (2017-2018), 1 uczestnik stażu podoktorskiego z Uniwersytetu w Turynie, Włochy (Tabela 2, pkt. 7)
- Opiekun naukowy (2016, 2017, 2019), 5 słuchaczy KI Summer Research School (Tabela 2, pkt. 4, 6, 11-13)

Tematy prac magisterskich:

1. "*A study of the potential efficacy of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor Linagliptin to counteract brain complications in type 2 diabetes mellitus"* – Ioni Appelberg (2015)
2. "*Effects of diabetes on parvalbumin-containing interneurons in hippocampus: a potential mechanism at the basis of decreased cognition in diabetes"*– Joakim Nielsen (2016)

Tematy prac licencjackich:

1. "*Impaired neuroplasticity at the basis of olfactory dysfunction in type 2 diabetes"* – William Davidsson (2017)
2. "*Type 2 diabetes induces neuroplasticity impairment mediated by GABAergic interneurons and doublecortin-expressing neurons in the piriform cortex of mice"* – Ellinor Kjellgren (2018)

Nadzorowałam również wykonanie projektu (Junior Research Project) w ramach studiów licencjackich:

- *"Impaired neuroplasticity at the basis of olfactory impairment in type 2 diabetes"* –Sandro Meunier (2018)

Tabela 2. Opieka naukowa nad studentami i uczniami

Lp.	Okres	Student	Program	Moja rola
1.	2015	Ioni Appelberg	Degree project in Medicine (KI*)	Główny opiekun naukowy, promotor pracy magisterskiej
2.	2015-2016	Joakim Nielsen	Degree project in Medicine (KI)	Główny opiekun naukowy, promotor pracy magisterskiej
3.	2015-2016	Emanuel Candeias	Doktorant z Uniwersytetu w Coimbrze – współpraca naukowa z KI	Współudział w opiece naukowej
4.	2016	Timo Ostervald	KI Summer Research School	Główny opiekun naukowy
5.	2017	William Davidsson	Degree Project in Biomedicine (KI), Bachelor level	Główny opiekun naukowy, promotor pracy licencjackiej
6.	2017	Emily Ljungqvist	KI Summer Research School	Główny opiekun naukowy
7.	2017-2018	Fausto Chiazza	Staż podoktorski na KI i współpraca naukowa z Uniwersytetem w Turynie	Współudział w opiece naukowej
8.	2018	Ellinor Kjellgren	Degree Project in Biomedicine (KI), Bachelor level	Główny opiekun naukowy, promotor pracy licencjackiej
9.	2018	Sandro Meunier	Master's Programme in Biomedicine (KI)	Główny opiekun naukowy
10.	2019	Federico Ugazio	Uczestnik studiów magisterskich na Uniwersytecie Piemonte Orientale – współpraca naukowa z KI	Główny opiekun naukowy
11.	2019	Moa Asmundsson	KI Summer Research School	Główny opiekun naukowy
12.	2019	Sara Helleberg	KI Summer Research School	Współudział w opiece naukowej
13.	2019	Marcus Chang	KI Summer Research School	Współudział w opiece naukowej

*Karolinska Institutet, Sztokholm

Piśmiennictwo

1. WHO. *Diabetes*. 2020: *https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1*
2. Buttermore E., et al. *Diabetes Metab Syndr*, 2021. **15**(5): p. 102253
3. Dziemidok P., et al., *Ann Agric Environ Med*, 2011. **18**(2): p. 318-22
4. *Przewlekłe powikłania cukrzycy – jak cukrzyca niszczy organizm?*: *https://cukrzyca.pl/cukrzyca/przewlekle-powiklania-cukrzycy/*
5. Daulatzai M.A., *J Neural Transm (Vienna)*, 2015. **122**(10): p. 1475-97

6. Doty R.L., *Lancet Neurol*, 2017. **16**(6): p. 478-488
7. Jorgensen M.B. and Buch N.H., *Acta Otolaryngol*, 1961. **53**: p. 539-45
8. Le Floch J.P., et al., *Diabetes Care*, 1993. **16**(6): p. 934-7
9. Gouveri E., et al., *Angiology*, 2014. **65**(10): p. 869-76
10. Naka A., et al., *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010. **267**(4): p. 547-50
11. Bramerson A., et al., *Laryngoscope*, 2004. **114**(4): p. 733-7
12. Biessels G.J. and Reagan L.P., *Nat Rev Neurosci*, 2015. **16**(11): p. 660-71
13. Cukierman T., et al., *Diabetologia*, 2005. **48**(12): p. 2460-9
14. Kalaria R.N., *Nat Rev Neurol*, 2009. **5**(6): p. 305-6
15. Kodl C.T. and Seaquist E.R., *Endocr Rev*, 2008. **29**(4): p. 494-511
16. Xu W., et al., *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2928-35
17. Sanke H., et al., *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. **106**(3): p. 465-73
18. Xu Z.P., et al., *EBioMedicine*, 2016. **5**: p. 105-13
19. Altundag A., et al., *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2017. **274**(6): p. 2621-2627
20. Patterson D.S., et al., *Nature*, 1966. **209**(5023): p. 625
21. Zaghloul H., et al., *Diabet Med*, 2018. **35**(1): p. 41-52
22. Lietzau G., et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2018. **6**(1): p. 14
23. Lietzau G., et al., *Oncotarget*, 2016. **7**(5): p. 5865-76
24. Zhang Z., et al., *Diabetes Care*, 2019. **42**(7): p. 1274-1283
25. Cassano T., et al., *Behav Brain Res*, 2011. **224**(2): p. 408-12
26. Coronas-Samano G., et al., *Front Aging Neurosci*, 2016. **8**: p. 268
27. Larsson M., et al., *Neurobiol Aging*, 2016. **38**: p. 118-126
28. Roman F.S., et al., *Neurobiol Aging*, 1996. **17**(1): p. 31-40
29. Seubert J., et al., J Gerontol A *Biol Sci Med Sci*, 2017. **72**(8): p. 1072-1079
30. Young J.W., et al., *Neurobiol Aging*, 2009. **30**(9): p. 1430-43
31. Johnson D.M., et al., *J Neurosci*, 2000. **20**(18): p. 6974-82
32. Bekkers J.M. and Suzuki N., *Trends Neurosci*, 2013. **36**(7): p. 429-38
33. Gottfried J.A., *Nat Rev Neurosci*, 2010. **11**(9): p. 628-41
34. Riviere S., et al., *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 34011
35. Thiebaud N., et al., *J Neurosci*, 2014. **34**(20): p. 6970-84
36. Wakabayashi T., et al., *J Biol Chem*, 2016. **291**(29): p. 15196-211
37. *Medical Definition of Neuroplasticity*. 2021: *https://www.medicinenet.com/neuroplasticity/definition.htm*
38. Isaacson J.S., *Curr Opin Neurobiol*, 2010. **20**(3): p. 328-31
39. Saiz-Sanchez D., et al., *Exp Neurol*, 2016. **276**: p. 13-21
40. Hardy D. and Saghatelyan A., *Neurogenesis (Austin)*, 2017. **4**(1): p. e1301850
41. Sakamoto M., et al., *Front Neurosci*, 2014. **8**: p. 121
42. Bachor T.P., et al., *Neurobiol Dis*, 2017. **108**: p. 13-28
43. Lang B.T., et al., *Brain Res*, 2009. **1258**: p. 25-33
44. Klempin F., et al., *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25760
45. Nacher J. and Bonfanti L., *Front Neuroanat*, 2015. **9**: p. 62
46. Zhang Z., et al., *Diabetes*, 2018. **67**(5): p. 994-1006
47. *Diabetes can strike—hard—even when weight is normal*: *https://www.health.harvard.edu/blog/diabetes-can-strike-hard-even-when-weight-is-normal-201208085121*
48. Lacroix M.C., et al., *Chem Senses*, 2015. **40**(8): p. 537-56
49. Takase K., et al., *Obesity (Silver Spring)*, 2016. **24**(4): p. 886-94
50. Tucker K.R., et al., *Physiol Behav*, 2012. **107**(3): p. 424-32
51. Aime P., et al., *Front Behav Neurosci*, 2014. **8**: p. 326
52. Thanos P.K., et al., *Synapse*, 2013. **67**(4): p. 171-8
53. Biosa A., et al., *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(11): p. 8754-8763
54. Hu G., et al., *Diabetes Care*, 2007. **30**(4): p. 842-7
55. Xu Q., et al., *Diabetes Care*, 2011. **34**(4): p. 910-5
56. Yue X., et al., *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(18): p. e3549
57. Pagano G., et al., *Neurology*, 2018. **90**(19): p. e1654-e1662
58. Ter Horst K.W., et al., *Sci Transl Med*, 2018. **10**(442)
59. Savica R., et al., *Mov Disord*, 2012. **27**(8): p. 974-9

60. Simon K.C., et al., *Neurology*, 2007. **69**(17): p. 1688-95
61. Santiago J.A. and Potashkin J.A., *Neurobiol Dis*, 2014. **72 Pt A**: p. 84-91
62. Renaud J., et al., *Neurobiol Aging*, 2018. **69**: p. 117-128
63. Morris J.K., et al., *Exp Neurol*, 2011. **231**(1): p. 171-80
64. Nguyen J.C., et al., *Front Behav Neurosci*, 2017. **11**: p. 22
65. Barry R.L., et al., *PLoS One*, 2018. **13**(4): p. e0191299
66. Cone J.J., et al., *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e58251
67. Fritz B.M., et al., *Neuroscience*, 2018. **372**: p. 1-15
68. Jang Y., et al., *Exp Neurobiol*, 2017. **26**(2): p. 104-112
69. Speed N., et al., *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25169
70. Collier T.J., et al., *Mov Disord*, 2017. **32**(7): p. 983-990
71. Gilbert M.P. and Pratley R.E., *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 178
72. Darsalia V., et al., *Neuropharmacology*, 2018. **136**(Pt B): p. 280-286
73. Darsalia, V., et al., *Front Neurol*, 2019. **10**: p. 493
74. Drucker D.J. and Nauck M.A., *Lancet*, 2006. **368**(9548): p. 1696-705
75. Kastin A.J. and Akerstrom V., *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. **27**(3): p. 313-8
76. Holscher C., *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2010. **5**(2): p. 109-17
77. Patrone C., et al., *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014. **2**(3): p. 256-62
78. Candeias E.M., et al., *World J Diabetes*, 2015. **6**(6): p. 807-27
79. Bomba M., et al., *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e612
80. Wang X., et al., *Exp Ther Med*, 2016. **12**(5): p. 2885-2892
81. An J., et al., *Behav Brain Res*, 2019. **370**: p. 111932
82. Gumuslu E., et al., *Fundam Clin Pharmacol*, 2016. **30**(4): p. 376-84
83. Huang H.J., et al., *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39656
84. Park K.A., et al., *Pharmaceutics*, 2020. **12**(2)
85. Deacon C.F. and Holst J.J., *Expert Opin Pharmacother*, 2013. **14**(15): p. 2047-58
86. Chalichem N.S.S., et al., *J Alzheimers Dis Other Demen*, 2017. **32**(7): p. 444-451
87. Isik A.T., et al., *Diabetes Res Clin Pract*, 2017. **123**: p. 192-198
88. Nassar N.N., et al., *Neuropharmacology*, 2015. **89**: p. 308-17
89. Svenningsson P., et al., *Mov Disord*, 2016. **31**(9): p. 1422-3
90. Darsalia V., et al., *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1289-96
91. Chiazza F., et al., *Cardiovasc Diabetol*, 2018. **17**(1): p. 60
92. Darsalia V., et al., *Diabetes Obes Metab*, 2016. **18**(5): p. 537-41
93. Goto Y., et al., *Tohoku J Exp Med*, 1976. **119**(1): p. 85-90
94. Ostenson C.G. and Efendic S., *Diabetes Obes Metab*, 2007. **9 Suppl 2**: p. 180-6
95. Gavrilovici C., et al., *J Comp Neurol*, 2010. **518**(9): p. 1570-88
96. Verret L., et al., *Cell*, 2012. **149**(3): p. 708-21
97. Kook S.Y., et al., *Cell Death Differ*, 2014. **21**(10): p. 1575-87
98. Lehmkuhl A.M., et al., *J Vis Exp*, 2014(90): p. e51804
99. Chung L., *Dev Reprod*, 2015. **19**(2): p. 61-7
100. Gundersen H.J., et al., *APMIS*, 1988. **96**(10): p. 857-81
101. Howells D.W., et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010. **30**(8): p. 1412-31
102. Fluri F., et al., *Drug Des Devel Ther*, 2015. **9**: p. 3445-54
103. Narikiyo K., et al., *Nat Neurosci*, 2020. **23**(6): p. 741-753
104. Sasi M., et al., *Pflugers Arch*, 2017. **469**(5-6): p. 593-610
105. Fanelli C.G., et al., *Diabetes Metab Res Rev*, 2004. **20 Suppl 2**: p. S32-42
106. Snell-Bergeon, J.K. and Wadwa R.P., *Diabetes Technol Ther*, 2012. **14 Suppl 1**: p. S51-8
107. Lee C.W., et al., *Curr Alzheimer Res*, 2013. **10**(3): p. 298-308
108. McQuail J.A., et al., *Trends Mol Med*, 2015. **21**(7): p. 450-60
109. During M.J., et al., *Nat Med*, 2003. **9**(9): p. 1173-9
110. Huang J., et al., *Stroke*, 2013. **44**(1): p. 190-7
111. Rohnert P., et al., *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 44
112. Badawi G.A., et al., *Inflammopharmacology*, 2017. **25**(3): p. 369-382
113. Kosaraju J., et al., *Mol Neurobiol*, 2017. **54**(8): p. 6074-6084
114. Kosaraju J., et al., *J Pharm Pharmacol*, 2013. **65**(12): p. 1773-84
115. Ullberg T., et al., *Stroke*, 2015. **46**(2): p. 389-94

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych (1), organizacyjnych (2) oraz popularyzujących naukę (3) lub sztukę

1a) Prowadzenie zajęć dydaktycznych:

- „*Anatomia z elementami Neurobiologii*" – laboratoria, ćwiczenia, seminaria
  Wydział Lekarski GUMed, kierunek Lekarski, I rok (2005-2014, 2020-do chwili obecnej)
- „*Gross Anatomy and Neuroscience*" – laboratoria, ćwiczenia, seminaria
  Wydział Lekarski GUMed, *English Division*, I rok (2006-2014, 2020-do chwili obecnej)
- „*Anatomia prawidłowa*" – laboratoria, ćwiczenia, seminaria
  Wydział Nauk o Zdrowiu, kierunek Elektroradiologia, I rok (2008-2012, 2021/2022)
- „*Praktyczne aspekty zastosowania anatomii*" – fakultet
  Wydział Lekarski GUMed, kierunek Lekarski oraz *English Division*, I rok (2011-2014)
- „*Anatomia prawidłowa człowieka*" – ćwiczenia
  sopocki oddział Szkoły Wyższej Psychologii Społecznej (SWPS), kierunek Fizjoterapia, I rok (2010/2011)

1b) W ramach podnoszenia kwalifikacji zawodowych, ukończenie kursów dotyczących nowoczesnych metod kształcenia studentów uczelni wyższych:

- *Kurs dydaktyki akademickiej* (nr 2012-708-148), zorganizowany przez Dział Oceny Jakości Kształcenia GUMed, 2012
- *Pedagogika dorosłych* – kurs *online*, GUMed, 2021

1c) Wpisana do protokołu oficjalna pochwała działalności dydaktycznej od studentów I roku kierunku Lekarskiego GUMed na Radzie pedagogicznej, styczeń 2014

1d) Ocena projektów badawczych realizowanych przez studentów Karolinska Institutet w ramach uzyskania licencjatu z biomedycyny (Biomedicine Degree Projects) oraz rola egzaminatora w trakcie obrony prac licencjackich, lata 2018-2020, liczba ocenionych projektów i przeegzaminowanych studentów: 5

2a) Unowocześnienie Pracowni biologii molekularnej Zakładu Anatomii i Neurobiologii:
Brałam aktywny udział w rozwoju potencjału badawczego Zakładu Anatomii i Neurobiologii GUMed. W 2012 roku przygotowałam projekt zakupu wyposażenia do pracowni biologii molekularnej w postaci aparatu do ilościowego PCR. Z mojej inicjatywy zakupiono: aparat LightCycler® 480 (*Roche Diagnostics*), aparat do transferu pionowego (*BioRad*), a także inny drobny sprzęt laboratoryjny (m.in. mikrowirówkę i zestawy pipet automatycznych (*Eppendorf*)), co umożliwiło wdrożenie nowych metod badawczych w naszej jednostce.

2b) Byłam członkiem komisji skrutacyjnej w trakcie zebrania wyborczego nauczycieli akademickich z I Okręgu Wyborczego wybierających elektorów oraz przedstawicieli do Rady Wydziału i Senatu GUMed, 7 marzec 2012

2c) Udział w organizacji kongresów:

- XIII-tego Międzynarodowego Kongresu Histochemii i Cytochemii "*Imaging of cell Dynamics*", Gdańsk, 23-27 sierpień 2008
- XXXI-ego Kongresu Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Strzelinko, 27-30 czerwiec 2013

3a) Udział w tłumaczeniu podręcznika akademickiego:

Hansen JT.: *Anatomia Nettera do kolorowania*. Rozdziały: Układ oddechowy i układ wewnątrzwydzielniczy. Wyd. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2010, ISBN: 978-83-7609-252-2 (wyd.2 Edra Urban & Partner 2015, pISBN: 978-83-65195-02-9)

3b) Jestem pierwszą autorką 2 publikacji przedstawiających podsumowanie wyników prowadzonych przeze mnie w grupie NeuroCardioMetabol (KI) badań przedklinicznych w czasopiśmie branżowym dla lekarzy w Szwecji:

- **Lietzau G.**, Nyström T., Östenson C.G., Darsalia V., Patrone C. (2016) Diabetesrelaterade förändringar i piriforma hjärnbarken kan motverkas efter receptoraktivering av glukagonlik peptid-1 (GLP-1). *BestPractice*, 19 June;32-34
- **Lietzau G.**, Östenson C.G., Skogsberg J., Nyström T., Darsalia V., Patrone C. (2018) Luktförmåga och olfaktorisk neuroplasticitet förbättras av dpp-4-hämmaren linagliptin vid typ 2-diabetes. *BestPractice*, *online* Jul 2018

3c) Prezentacja aktywności naukowych prowadzonych w grupie NeuroCardioMetabol (*http://ki.se/en/kisos/the-neurocardiometabol-group*) podczas ***Tygodnia badań***: "2018 års FoUUi-vecka Idé och kunskap på Sös" – to rokrocznie organizowane w Södersjukhuset (Sös) wydarzenie daje szansę na prezentację grup badawczych oraz zapoznanie się z wynikami prowadzonych w KI Sös badań naukowych przez personel i pacjentów szpitala, a także zainteresowanych tą tematyką mieszkańców Sztokholmu.

3d) Opieka i nadzór naukowy nad uczniami liceum w ramach organizowanej w Karolinska Institutet szkoły letniej: ***KI Summer Research School***. Moja rola polegała na przedstawieniu i zainteresowaniu młodzieży pracą naukową, a także nadzorze nad wykonaniem mini-projektu badawczego i napisaniem krótkiego raportu z jego realizacji. Lista nadzorowanych przeze mnie uczestników tego programu (lata 2016-2017, 2019) znajduje się w Tabeli 2.

7. Inne istotne informacje dotyczące kariery zawodowej

W trakcie mojej kariery zawodowej szczególną wagę przywiązuję do podnoszenia kwalifikacji zawodowych. Dlatego też brałam udział w szeregu kursów, szkoleń i warsztatów (w kraju i za granicą), które pozwoliły mi na rozwój kompetencji zawodowych zarówno pod kątem rozszerzenia posiadanej wiedzy merytorycznej (jako że tematyka mojego doktoratu dotyczyła udaru mózgu, przez szereg lat uczestniczyłam np. w forach udarowych i zjazdach Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu: pkt. 8, 12, 15, 22, 27), prowadzenia badań doświadczalnych (szkolenia na temat prowadzenia doświadczeń na zwierzętach: pkt. 21 i 30), nowoczesnych metod i technik z zakresu biologii molekularnej i biomedycyny (pkt. 1, 3, 6-7, 10-11, 13-14, 16, 24, 28-29, 34, 40-41), jak i aplikowania o środki na ich realizację (pkt. 9, 31 i 33), analizę danych (pkt. 25-26) i publikowanie uzyskanych wyników (pkt. 23, 35).

Kursy, warsztaty i seminaria:

1. Warsztaty laboratoryjne z biotechnologii: *„Laboratoryjne i komputerowe metody badania DNA"* Olsztyn, wrzesień 2000
2. Szkolenie techniczne w Promega, Monachium, marzec 2001
3. Kurs: *„Analiza ekspresji genów metodami Real-Time PCR i RT-PCR"* w Instytucie Zoologii PAN w Warszawie, wrzesień 2003
4. Kurs: *„Najnowsze osiągnięcia w technikach biologii molekularnej"* zorganizowany przez Applied Biosystems, marzec 2004

5. Kurs „*Jak realizować zasady GLP (ang.: Good Laboratory Practice) w laboratoriach kontrolnych”,* Warszawa, maj 2004
6. Kurs: *„Sekwencjonowanie DNA i analiza wyników”* w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w IBB w Warszawie, wrzesień 2004
7. Szkolenia nt. technik i metod stosowanych w barwieniach immunohistochemicznych zorganizowane przez firmę BIOKOM w Katedrze Histologii i Immunologii AMG, Gdańsk, maj 2007 i wrzesień 2010
8. IX Interdyscyplinarne Forum Udarowe Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu: „*Wieloogniskowe zmiany niedokrwienne mózgu i ich konsekwencje kliniczne”*, Toruń, październik 2009
9. Szkolenie: „*Pomysł-Projekt-Pieniądz Aktualne możliwości finansowania indywidualnych projektów badawczych ze źródeł międzynarodowych”*, Gdańsk, październik 2009
10. Warsztaty: „*Wykorzystanie metody amplifikacji w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) w oznaczeniach ilościowych i jakościowych*” zorganizowane przez Roche, Toruń, wrzesień 2010
11. Praktyczny kurs: „*Real-Time PCR Ekspresja Genów*” DNA-Gdańsk, Gdańsk wrzesień 2010
12. X Interdyscyplinarne Forum Udarowe Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu „*Żylne udary mózgu*” Bydgoszcz, październik 2010
13. Warsztaty: „*Mikromacierze. Analiza danych z użyciem programu GeneSpring”*, organizowane przez ELSEVIER Urban&Partner, Warszawa, czerwiec 2011
14. Konferencja naukowa: „*Genomika 2011. Technologie, diagnostyka medyczna, zastosowania”*, organizowane przez ELSEVIER Urban&Partner, Warszawa, czerwiec 2011
15. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu „*Postępy w diagnostyce i leczeniu niedokrwiennego udaru mózgu*”, Toruń, październik 2011
16. Seminarium: „*Hodowle komórek ssaczych*” zorganizowane przez firmę Merck, Gdańsk, kwiecień 2012
17. Kurs „*Dydaktyka Akademicka*”, GUMed, Gdańsk, kwiecień-maj 2012
18. „*Europa zaprasza mobilnych naukowców*.” spotkanie informacyjne zorganizowane przez Regionalny Punkt Kontaktowy ds. 7. PR UE przy Politechnice Gdańskiej, Gdańsk, maj 2012
19. Szkolenie: *Tworzenie raportów cytowań na Web of Science*, (*online*), czerwiec 2012
20. Szkolenie: „*Indywidualne stypendia wyjazdowe w 7. Programie Ramowym UE – wskazówki jak przygotować wniosek. EURAXESS – europejski portal dla naukowców*.” – zorganizowane w ramach Punktu Kontaktowego ds. 7. Programu ramowego przy UG – konsorcjum „Platforma współpracy Punktów Kontaktowych ds. Programów Unii Europejskiej w Regionie Północnym”, Gdańsk, czerwiec 2012
21. „*Szkolenie dla osób przeprowadzających doświadczenia na zwierzętach (myszy, szczury)*” zorganizowane przez Trójmiejską Akademicką Zwierzętarnię Doświadczalną – Centrum Badawczo-Usługowe, GUMed (nr kursu 2012-748-151), Gdańsk, wrzesień 2012
22. XI Interdyscyplinarne Forum Udarowe Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu: „*Udar krwotoczny mózgu*”, Jurata, wrzesień 2012
23. Szkolenie „*Jak skutecznie pisać publikacje naukowe*” w ramach konferencji Bioinnovation International Summit, Gdańsk, październik 2012
24. Szkolenie operatorsko-aplikacyjne z obsługi aparatu LightCycler® 480 firmy Roche, Gdańsk, listopad 2012
25. Kurs: “*Podstawy biostatystyki w oparciu o pakiet Statistica.pl*” zorganizowany przez Studium Nauczania Matematyki, Statystyki i Informatyki Wydziału Farmaceutycznego GUMed, Gdańsk, luty 2013
26. Kurs "*Regresja logistyczna w badaniach medycznych i przyrodniczych*", z zakresu wykorzystania oprogramowania STATISTICA zorganizowany przez StatSoft, Gdańsk, kwiecień 2013
27. XII Interdyscyplinarne Forum Udarowe Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu: „*Zespoły sercowo-mózgowe i mózgowo- sercowe*”, Jurata, wrzesień 2013
28. Seminaria: „*Odwrotna transkrypcja i Real-time PCR – technika, źródła najczęstszych problemów i ich rozwiązania*”, „*Klonowanie molekularne – optymalizacja techniki*”, „*Technologia RNAi i jej zastosowanie w badaniach biologicznych*” - zorganizowane na GUMedzie przez ThermoScientific, Darmacon oraz ABO sp. z o.o., Gdańsk, maj 2014
29. Warsztaty “*Zastosowanie spektrometrii mas w proteomice i genomice*” – zorganizowane w ramach projektu MOB14Health przez Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z firmami KAWA.SKA, SEQUENOM i AB SCIEX, Gdańsk, czerwiec 2014
30. Kurs teoretyczny i praktyczny: „*Laboratory Animal Science for Researchers – Rodents and Lagomorphs”* – zakończony uzyskaniem certyfikatu FELASA kat. B, KI, Sztokholm, październik/listopad 2014
31. Grant Writing Workshop: *“Scientific Grant Writing. The Practical Approach”* prowadzony przez Angelikę Hofmann z Yale University w KI, Sztokholm, listopad 2015 i kwiecień 2017

32. Kurs: "*Neurodegenarative disorders - from molecule to treatment"* – KI, Sztokholm, październik 2015
33. Kurs: *"Successful grant applications: getting it right"* zorganizowany przez Elsevier Publishing Campus, (*online*), luty 2016
34. Seminarium: *„Badania ekspresji genów na różnych poziomach - optymalne zastosowanie reakcji qPCR i systemów genów reporterowych lucyferazy"* zorganizowane przez Promega na GUMed, Gdansk, maj 2016
35. Warsztaty KIB: *"Choosing a journal to publish in"* biblioteka KI, Sztokholm, marzec 2017
36. Symposium: *"Cardiometabolic Risk and Vascular Disease: from Mechanisms to Treatment"* KI, Sztokholm, grudzień 2017
37. *"CPR course with guidelines from the Swedish Resuscitation Council"*, Södersjukhuset, Sztokholm, grudzień 2017
38. Kurs języka szwedzkiego, poziom A1+, BBi Communication, Sztokholm, semestr zimowy 2018
39. Warsztaty: „*Presentation Skills for Postdocs"* zorganizowane przez KIPA (Karolinska Institutet Postdoc Association), Sztokholm, wrzesień 2018
40. Warsztaty nt. hodowli organoidów, zorganizowane przez Karolinska Stem & Cell Organoid/Murine Stem Cell Unit, BioNut, KI, maj 2019
41. Seminarium: *„Bio-Plex® User Meeting Stockholm"*, zorganizowane przez BioRad, KI Solna, Sztokholm, październik 2019
42. Seminarium: *"More than bystanders, learning what microglia do in dementia"* – KI, (*online*), wrzesień 2020
43. Webinar: "*Writefull – narzędzie do korekty tekstów naukowych*" – Jacek Lewinson, listopad 2020
44. Kurs: *„Pedagogika dorosłych"* organizowany przez GUMed, wrzesień-październik 2021

PODPIS ZAUFANY
GRAŻYNA EWA
LIETZAU
20.03.2022 14:05:09 [GMT+1]
Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym

(podpis wnioskodawcy)