

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Grzegorz Sulkowski

2. Posiadane dyplomy:

-Dyplom ukończenia studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie, 1992 rok. Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin: „Wpływ ksantotoksyny na morfogenezę korzeni zarodkowych oraz na inicjację korzeni przybyszowych wybranych gatunków roślin.” Uzyskany tytuł: magister biologii, specjalność - biologia ogólna.

-Dyplom doktora nauk medycznych uzyskany w Instytucie Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, 2002 rok. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wrażliwość zakończeń nerwowych mózgu szczura na całkowite niedokrwienie i przywrócenie krążenia.” Uzyskany stopień naukowy: doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

-Dyplom ukończenia kursu (część I i II) „Statystyczna metodologia badań klinicznych”, 2001 rok, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

-Dyplom ukończenia kursu „Inspektor Ochrony Radiologicznej typu B”, 1998 rok, Państwowa Agencja Atomistyki.

-Dyplom ukończenia kursu „Inspektor Ochrony Radiologicznej typu: IOR-1”, 2003 rok, Państwowa Agencja Atomistyki.

-Dyplom ukończenia kursu „Inspektor Ochrony Radiologicznej typu: IOR-0, IOR-1”, 2008 rok, Państwowa Agencja Atomistyki.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu (przebieg pracy zawodowej)

1992-1997, asystent w Zakładzie Serologii, Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa.

1997-2003, asystent, Zakład Neurochemii, Pracownia Patobiochemii Ośrodkowego Układu Nerwowego, Instytut-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa.

2003-obecnie, adiunkt, specjalista, Zakład Neurochemii, Pracownia Patoneurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa.

1998- obecnie, inspektor ochrony radiologicznej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

4. Opis szczegółowych osiągnięć naukowych:

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

„Rola ekcytotoksyczności glutaminianu w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE) szczura – badanie potencjału neuroprotektynowego antagonistów receptorów glutaminianergicznych.”

Wykaz publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny- biologia medyczna:

- a) Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Chalimoniuk M., Strużyńska L. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 2013, 261: 67-76. (IF: 3,033), MNiSW: 25 pkt.
- b) Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L. Modulation of neurological deficits and expression of glutamate receptors during experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with selected antagonists of glutamate receptors. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 186068, pages 11, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/186068>. (IF: 2,880), MNiSW: 20 pkt.
- c) Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Kwiatkowska-Patzer B., Strużyńska L. Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathologica*, 2009; 47(4): 327-337. (IF: 1,143), MNiSW: 20 pkt.
- d) Mitosek-Szewczyk K., Sulkowski G., Stelmasiak Z., Strużyńska L. Expression of glutamate transporters GLT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, 2008, 155: 45-52. (IF: 3,556), MNiSW: 30 pkt.

Sumaryczny IF w/w prac: IF: 10.612, MNiSW: 95 pkt.

Streszczenie prac:

Ad. a

Rozwijający się proces zapalny i ekcytotoksyczne uszkodzenia komórek ośrodkowego układu nerwowego przez glutaminian odgrywają znaczącą rolę podczas patologii EAE. Prezentowane w pracy wyniki badań mikroskopowych przeprowadzone technikami immunohistochemicznymi z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał wykazały aktywację i proliferację mikrogleju i astrocytów w mózgach zwierząt w ostrej fazie

EAE. Towarzyszyła temu zwiększona ekspresja prozapalnych cytokin (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) i chemokin (fraktalkina, MIP-1 i MIP-3). W grupach zwierząt EAE poddanych leczeniu przy użyciu amantadyny i memantyny zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Nie zanotowano natomiast zmian w ekspresji cytokin prozapalnych na poziomie białka po terapii zarówno z antagonistami receptorów NMDA (amantadyną i memantyną), jak i antagonistami mGluR G I (LY 367385 i MPEP). Podczas ostrej fazy EAE w mózgach zaobserwowano wzrost poziomu białka dwóch enzymów iNOS i COX-2. Terapia z zastosowaniem badanych antagonistów (amantadyny, memantyny, LY 367385, MPEP) nie wpływała na poziom tych białek.

Ad. b

Celem naszych badań było zbadanie roli receptorów metabotropowych grupy I (mGluR G I) i receptorów NMDA w patomechanizmie EAE. Oznaczono wpływ antagonistów: LY 367385 – (antagonista mGluR1), MPEP – (antagonista mGluR5) oraz amantadyny i memantyny – (antagoniści receptorów NMDA) na modulację deficytów neurologicznych obserwowanych u szczurów EAE. Badano także wpływ w/w antagonistów na ekspresję receptorów mGluR G I (mGluR1 i mGluR5) i NMDA na poziomie mRNA i białka. Antagoniści receptorów NMDA (amantadyna i memantyna) wywierali neuroprotektoryjny efekt na rozwój choroby i hamowali pojawianie się deficytów neurologicznych oraz poprawiali ogólny stan leczonych zwierząt. Antagoniści receptorów mGluR G I (LY 367385 i MPEP) nie wykazywali działania protekcyjnego na rozwój deficytów neurologicznych. Poczynając od 8 do 25 dnia po immunizacji zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji białka dla receptorów mGluR1, mGluR5 i NMDA. Zmianom w poziomach białka towarzyszył około 300% wzrost ekspresji mRNA. Amantadyna i memantyna powodowały obniżenie poziomu wszystkich badanych receptorów zarówno na poziomie mRNA jak i białek. Podanie LY 367385 (antagonisty receptorów mGluR1) powodowało wzrost poziomu mRNA i podwyższenie poziomu białka dla mGluR1. Podanie MPEP (antagonisty mGluR5) powodowało wzrost poziomu mRNA i białka receptorów mGluR5. Jednoczesne podawanie antagonistów receptorów NMDA (amantadyny i memantyny) z antagonistami mGluR G I (LY367385 i MPEP) nie miało dalszego zauważalnego wpływu na zmiany poziomów mRNA i białek badanych receptorów.

Ad. c

Pomiary wychwytu i uwalniania glutaminianu przeprowadzono na dwóch frakcjach błon komórkowych: synaptosomalnej - pochodzenia neuronalnego, oraz GPV - pochodzenia astrocytarnego. Oznaczenia wykonano technikami izotopowymi z użyciem znakowanego glutaminianu. Badania wykazały u zwierząt EAE (w szczycie choroby - 12 d.p.i.) zwiększony wychwyty glutaminianu z przestrzeni zewnętrznej, zarówno w przypadku frakcji synaptosomalnej, jak i frakcji błonowej pęcherzyków pochodzenia astrocytarnego (GPV). Zanotowano również zwiększone uwalnianie glutaminianu z obu frakcji (synaptosomalnej i GPV) o około 20% po depolaryzacji błon w obecności KCl. Obserwowane zmiany w transporcie glutaminianu (wzrost zarówno wychwyty jak i uwalniania) sugerują, że podczas ostrej fazy EAE może dochodzić do zwiększenia poziomu glutaminianu w przestrzeniach synaptycznych. W ostrej fazie EAE zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji białek: transporterów glutaminianu (GLT-1, EAAC1), metabotropowych glutaminianergicznych receptorów grupy I (mGluR 1 i mGluR5) oraz cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6 i TNF- α).

Ad. d

Transport glutaminianu w ośrodkowym układzie nerwowym odbywa się za pomocą białek transportujących zlokalizowanych na błonach komórkowych zarówno neuronów (transporter EAAC1) jak i astrocytów (transportery GLAST GLT-1). Oznaczenia wykonane na izolowanych frakcjach (synaptosomalnej i GPV) potwierdziły wzrost ekspresji białek transporterowych ekspresjonowanych na astrocytach (GLT-1), jak i na neuronach (EAAC1) w szczycie choroby EAE (12 d.p.i.). Ekspresja białka transportera GLAST była niezmienną. Poziom mRNA dla transporterów GLT-1 i GLAST oznaczony w różnych strukturach mózgowia (przodomózgowiu i mózdzku) wzrastał powyżej wartości kontrolnych i był skorelowany w czasie z nasileniem się deficytów neurologicznych u zwierząt EAE. Nie zaobserwowano korelacji czasowej pomiędzy ekspresją mRNA i poziomem białek badanych transporterów. Odnotowano obniżenie ekspresji białka transportera GLAST (zarówno w mózdzku jak i w przodomózgowiu) oraz transportera GLT-1 (w mózdzku) pomiędzy 8-20 d.p.i. W przodomózgowiu natomiast ekspresja białka GLT-1 wzrastała we wczesnych (4-6 d.p.i.) i późnych (20-25 d.p.i.) stadiach choroby, podczas gdy w szczycie EAE (8-12 d.p.i.) zaobserwowano obniżenie poziomu białka transportera GLT-1. Obserwowane zmiany w

ekspresji mRNA i białek badanych transporterów świadczą o ich zaangażowaniu w regulację poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu w przebiegu patologii EAE.

Opis osiągnięcia:

„Rola ekscytotoksyczności glutaminianu w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE) szczura – badanie potencjału neuroprotecyjnego antagonistów receptorów glutaminianergicznych.”

Wstęp

Autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE – experimental autoimmune encephalomyelitis) jest zwierzęcym modelem powszechnie przyjętym w badaniach patomechanizmów stwardnienia rozsianego – sclerosis multiplex (SM). SM to najczęstsza choroba zapalno-demielinizacyjna układu nerwowego. Z reguły dotyczy ludzi młodych między 20 a 40 rokiem życia. Zapadają na nią częściej kobiety, mieszkańcy umiarkowanych stref geograficznych, wysoko rozwiniętych krajów zachodniego kręgu cywilizacyjnego. Na SM choruje na świecie ponad 1 milion, w Europie około 450 tysięcy, a w Polsce ponad 40 tysięcy osób. Polska leży w obszarze zwiększonego ryzyka zachorowania, gdzie współczynnik zachorowalności przekracza 30/100 000, a w Wielkopolsce nawet 51/100 000. SM stanowi coraz większy problem nie tylko kliniczny, ale i społeczny (Thompson i Bowling, 2011). Dotychczas nie ma leku, który cofałby objawy tej choroby. Dostępne jest tylko leczenie łagodzące objawy - glikokortykosteroidy, immunoterapia (interferon β i γ), leczenie immunosupresyjne. Lekami z wyboru są związki o silnym działaniu cytotoksycznym (antybiotyki, immunosupresanty), często wywołujące objawy niepożądane.

Etiologia choroby nie jest dokładnie poznana. W aktualnych dyskusjach na temat przyczyn SM uwzględnia się dwie teorie: 1) wirusową, która zakłada się, że wirus lub wirusy o działaniu powolnym są czynnikiem sprawczym choroby oraz 2) autoimmunologiczną, wskazującą na rolę zasadowego białka mieliny (MBP) w tworzeniu przeciwciał przeciwko własnej mielinie. Istnieje również próba łączenia obu teorii, mówiąca, że pierwotną rolę w wyzwalaniu autoagresji odgrywa infekcja wirusowa (Levin i in. 2002, Bitsch i in. 2000).

Charakterystyczną oznaką choroby jest pojawianie się uszkodzeń osłonek mielinowych w istocie białej rdzenia kręgowego i mózgu. Pierwszym patologicznym mechanizmem jest przeniknięcie komórek układu immunologicznego (limfocytów i makrofagów) z krążenia obwodowego do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Makrofagi i zaktywowane komórki mikrogleju mogą generować wolne rodniki tlenowe, uwalniać cytotoksyczne aminokwasy pobudzające, aktywować komplement, produkować cytokiny prozapalne oraz przeciwciała skierowane przeciwko osłonkom mielinowym. W obszarach ognisk (plak) demielinizacyjnych zaobserwowano limfocyty, makrofagi i aktywne komórki mikrogleju, co sugeruje ich zaangażowanie w procesy demielinizacji (Cuzer i in. 1998). Wszystkie te czynniki mogą prowadzić do uszkodzeń oligodendrocytów i mieliny, a następnie degeneracji aksonów i śmierci neuronów. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na udział aminokwasów pobudzających w rozwoju SM (Groom i in. 2003, Choi 1998, Pitt i in. 2000). W mózgu i płynie mózgowo rdzeniowym osób chorych zaobserwowano podwyższony poziom glutaminianu (Choi 1998, Pitt i in. 2000, Klivenyi i in. 1997). Zmiany w homeostazie glutaminianu były obserwowane w obszarach ognisk demielinizacyjnych (Groom i in. 2003). Zewnątrzkomórkowe stężenie glutaminianu musi być ściśle kontrolowane, gdyż jego nadmiar powoduje nadmierną stymulację receptorów glutaminianergicznych, co w konsekwencjach prowadzi do śmierci komórek OUN - zjawisko to nosi nazwę ekscytotoksyczności (Pitt i in. 2000, Klivenyi i in. 1997, Choi 1997). Szereg zarówno ostrych jak i przewlekłych procesów neurodegeneracyjnych może być związane z: a) nadmiarem egzogenego glutaminianu lub agonistów jego receptorów, b) nadmiernym uwalnianiem endogenego glutaminianu z neuronów np. podczas urazu mózgu, c) nadmierną aktywacją receptorów glutaminianergicznych (Meldrum 2000, Doble 1999).

Kwas glutaminowy jest głównym neuroprzekaźnikiem o działaniu pobudzającym w mózgu ssaków. Działa on na układ nerwowy za pośrednictwem wielu specyficznych rozmieszczonych pre- i post- synaptycznie receptorów glutaminianergicznych (GluRs) oraz transporterów dla aminokwasów pobudzających (EAATs - excitatory amino acid transporters). Istnieją dwa podstawowe typy receptorów dla glutaminianu: jonotropowe (iGluRs) – będące w istocie bramkowanymi przez ligandy kanałami jonowymi oraz metabotropowe (mGluRs) sprzężone poprzez białka G z wewnątrzkomórkowymi układami przekazywania sygnału (Meldrum 2000, Conn i Pin 1999, Bruno i in. 2000).

Glutaminianergiczne receptory jonotropowe (iGluR) zostały podzielone na trzy klasy: AMPA - (pobudzane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy;

AMPA), KA - (pobudzane przez kwas kainowy; KA) i NMDA - (pobudzane przez kwas N-metylo-D-asparaginowy; NMDA). Receptory klasy AMPA i KA są ekspresjonowane na oligodendrocytach i neuronach (Yoshioka i in. 1996, Matute i in. 1997). Receptory jonotropowe klasy NMDA są ekspresjonowane na neuronach, komórkach mikrogleju i astrocytach (Verkhratsky i Kirchoff 2007). W badaniach *in vitro* agoniści wszystkich trzech klas iGluR (glutaminian, NMDA, kainian i AMPA) nawet w niskich stężeniach wywoływali toksyczne uszkodzenia neuronów i oligodendrocytów (McDonald i in. 1998, Ikonamidu i Turski 1996).

Metabotropowe receptory glutaminianegiczne (mGluR) są powiązane poprzez białka G z systemem wtórnych przekazników i regulują wiele funkcji wewnątrzkomórkowych (Schoepp i in. 1999). Według aktualnie obowiązującej klasyfikacji receptory mGluR dzieli się na trzy grupy, zgodnie z homologią sekwencji aminokwasowej, profilem farmakologicznym oraz typem szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego towarzyszącego aktywacji receptora (Schoepp i in. 1999). Grupa I mGluR (mGluR G I) – to receptory mGluR1_{a, b, c, d} oraz mGluR5_{a, b}; grupa II mGluR (mGluR G II) – to receptory mGluR2 i mGluR3; do grupy III mGluR (mGluR G III) zaliczamy receptory mGluR4_{a, b}, mGluR6, mGluR7_{a, b} oraz mGluR8_{a, b}. Wszystkie poznane dotychczas typy receptorów I grupy mGluR, powiązane są ze szlakiem aktywacji fosfolipazy C; natomiast stymulacja receptorów II i III grupy mGluR prowadzi do zahamowania cykazy adenylanowej (Schoepp i in. 1999).

Receptory mGluR grupy II i III są to receptory presynaptyczne, ich pobudzenie hamuje uwalnianie endogennego glutaminianu do przestrzeni synaptycznej. Występują w dużym zagęszczeniu w większości rejonów mózgu, głównie w korze mózgowej, wzgórzu, prążkowie i hipokampie. Ekspresjonowane są nie tylko na neuronach, ale również na powierzchni komórek glejowych.

Receptory mGluR grupy I (mGluR 1 i mGluR 5) są ekspresjonowane głównie na neuronach, ale występują też na astrocytach i komórkach mikrogleju (Bordoli i Ugolini 1999). Receptory mGluR uczestniczą w regulacji funkcji komórek glejowych i ich interakcji pomiędzy glejem i neuronami, poprzez regulację uwalniania i wychwytu glutaminianu w zakończeniach postsynaptycznych, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w patologii (Biber i in. 1999, Bruno i in. 1998). Występują w dużym zagęszczeniu w różnych obszarach mózgu, głównie mózdzku, wzgórzu, w obszarze CA 1 i zakrętu zębatego hipokampa; w mniejszych ilościach występują też w korze mózgowej, prążkowie i podwzgórzu. Receptory mGluR grupy I zlokalizowane są postsynaptycznie w rejonie określanym jako „pierścień

okołosynaptyczny”. Nie stwierdza się ich obecności w centrum synapsy, gdzie dominują receptory jonotropowe (iGluR), głównie AMPA czy NMDA (Bordli i Ugolini 1999, Geurts i in. 2003). Do aktywacji receptorów mGluR G I dochodzi prawdopodobnie w sytuacji, gdy w przestrzeni synaptycznej występuje nadmiar glutaminianu. Pobudzenie to wiąże się z aktywacją szlaku fosfolipazy C - (PLC), co prowadzi do depolaryzacji i wzrostu pobudliwości komórek nerwowych poprzez hamowanie prądów K^+ i aktywację nieselektywnych kanałów kationowych oraz do zwiększenia przewodnictwa poprzez receptory NMDA (Perroy i in. 2008).

Znane są wzajemne powiązania w oddziaływaniu pomiędzy receptorami jonotropowymi iGluRs a mGluRs G I. Badania elektrofizjologiczne wykazały funkcjonalne oddziaływanie receptorów mGluR G I i receptorów NMDA w różnych obszarach mózgu. Aktywacja receptorów mGluR5 wzmacniała odpowiedź wywołaną przez receptory NMDA (Perroy i in. 2008, Adamchik i Baskys 2000).

Dotychczas podjęte badania wykazały, iż w rozwój patologii SM/EAE są zaangażowane zarówno receptory jonotropowe (iGluRs), jak i metabotropowe (mGluRs). Wykazano, że w SM w uszkodzeniu oligodendrocytów przez interleukinę 1 beta ($IL-1\beta$) pośredniczą receptory AMPA/KA (Takahashi i in. 2003). Limfocyty T, biorące bezpośredni udział w odczynie zapalnym w mózgu, ekspresjonują funkcjonalną podjednostkę receptora AMPA GluR 3, która uczestniczy w aktywacji komórek T (Ganor i in. 2003). Jednakże wcześniej opisywane w literaturze badania z zastosowaniem antagonistów receptorów jonotropowych dla glutaminianu (iGluR) sprzężonych z kanałami jonowymi (NMDA, kainowe i AMPA) nie przyniosły pokładanych w nich nadziei. Wyniki tych badań nie znalazły bezpośredniego zastosowania w terapii, gdyż blokery kanału NMDA czy kompetyjni antagoniści całkowicie blokowali funkcję receptorów NMDA, co skutkowało licznymi działaniami ubocznymi (zaburzenia pamięci, drgawki, uzależnienia, czy zaburzenia psychiatryczne).

W badaniach klinicznych SM, jak i w wielu zwierzęcych modelach chorób zapalnych i neurodegeneracyjnych obserwowano również zmiany w ekspresji receptorów mGluR G I w OUN (Geurts i in. 2003, Ganor i in. 2003, Groom i in. 2003). Również wyniki prac doświadczalnych wykonanych na hodowlach komórkowych, dostarczają ciekawych informacji na temat możliwości wykorzystania substancji oddziaływujących na receptory metabotropowe dla glutaminianu mGluR w neuroprotekcji, w połączeniu z substancjami modulującymi funkcję receptorów NMDA (Ziemińska i in. 2003, Ziemińska i Łazarewicz

2006). Aktywacja receptorów mGluR G I wywołuje pobudzenie neuronów, dlatego nadmierna stymulacja tej grupy receptorów powinna mieć działanie toksyczne, a zablokowanie receptorów poprzez zastosowanie specyficznych antagonistów powinno prowadzić do efektów protekcyjnych.

Jeżeli w rozwoju procesu zapalnego, demielinizacji i neurodegeneracji w patologii SM istotną rolę odgrywa ekscytotoksyczność glutaminianu, to substancje modulujące funkcję receptorów NMDA (amantadyna i memantyna) oraz antagoniści mGluR G I, (mGluR1 i mGluR5, odpowiednio LY 367385 i MPEP) powinny wykazywać działanie protekcyjne, zmniejszać obserwowane uszkodzenia i przywracać zaburzone funkcje fizjologiczne. Ten aspekt nie był dotąd poznany w patologii EAE/SM, dlatego podjąłem badania dotyczące tego zagadnienia, uważając, że mogą one stanowić nowy i oryginalny wkład do doświadczalnej terapii SM.

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań było wyjaśnienie roli receptorów dla glutaminianu zarówno metabotropowych grupy I (mGluRs G I) i jonotropowych (NMDA) oraz zbadanie czy antagoniści w/w receptorów wykazują działanie protekcyjne w rozwoju uszkodzeń w mózgu szczura w patologii alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE). Osiągnięcie tego ogólnego celu realizowane było poprzez zbadanie:

- a) deficytów neurologicznych w chorobie EAE,
- b) zaburzeń w poziomach glutaminianu i jego transporcie podczas patologii EAE,
- c) zmian ekspresji receptorów (GluRs) i transporterów (EAATs) na poziomie białka i mRNA,
- d) zmian ekspresji wybranych białek - wyznaczników procesów zapalnych: interleukiny 1 beta (IL-1 β), interleukiny 6 (IL-6), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α), enzymów iNOS i COX-2 metodą Western blot,
- e) poziomów mRNA dla cytokin prozapalnych,
- g) czy substancje będące antagonistami receptorów glutaminianergicznych (amantadyna, memantyna, MPEP i LY 367385) zapobiegają wywołanym podczas EAE uszkodzeniom ośrodkowego układu nerwowego wykazując działanie neuroprotekcyjne.

Model EAE

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Lewis, samicach o masie ciała około 180-200g. EAE wywoływano poprzez iniekcję 100 µl szczepionki zawierającej 10 % homogenat rdzenia świnki morskiej, zawieszony w medium z kompletnym adjuwantem Freund's'a i wzbogaconym w *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra. Zwierzęta w grupach kontrolnych otrzymywały szczepionkę pozbawioną homogenatu rdzenia świnki morskiej. Badania, testy oraz pobieranie materiału do oznaczeń laboratoryjnych przeprowadzono w różnych fazach rozwoju choroby to jest w 4, 6, 8, 10, 12, 20 i 25 dniu po immunizacji (d.p.i.). Potencjalne substancje terapeutyczne (MPEP i LY 367385 w dawkach 10 mg/kg masy ciała/dzień, memantyna, w dawce 60 mg/kg masy ciała /dzień, a amantadyna w dawce 100 mg/kg m.c./dzień) podawano w postaci dootrzewnowych iniekcji przez 7 kolejnych dni, poczynając od 5-go d.p.i. Podczas całego eksperymentu prowadzono bardzo wnikliwą i dogłębną obserwację zwierząt eksperymentalnych. Obejmowała ona ocenę: ubytku masy ciała, deficytów neurologicznych zwierząt, długości fazy indukcyjnej choroby, czasu trwania choroby i śmiertelności.

Wyniki

1. Przebieg choroby EAE

Pierwszym objawem rozwijającego się EAE był ubytek masy ciała. W 8 dniu eksperymentu zwierzęta EAE we wszystkich grupach doświadczalnych osiągały najwyższą masę ciała. Począwszy od 9 do 13-15 d.p.i. obserwowano postępujący spadek masy ciała (około 20 -40%) w stosunku do masy wyjściowej. W 9-10 d.p.i. pojawiały się narastające deficyty neurologiczne, ostra faza EAE. Objawiała się ona stopniowo postępującym paraliżem, który obejmował ogon, następnie kończyny tylne i przednie. Deficyty oceniano według następującej skali: 0 – brak oznak deficytów neurologicznych, 1 – zwiotczenie ogona, 2 – osłabienie napięcia mięśniowego i częściowy paraliż kończyn tylnych, 3 – całkowity paraliż kończyn tylnych, 4 -paraplegia, 5 – śmierć zwierzęcia (Kerschensteiner i in. 2004). Szczyt choroby przypadał na 12-14 d.p.i., trwał około 3-4 dni, po czym paraliż stopniowo ustępował. Około 15-16 d.p.i. deficyty neurologiczne cofały się całkowicie, zwierzęta

zaczynały zdrowieć, stopniowo zwiększać masę ciała aby około 25 d.p.i. uzyskać masę wyjściową.

2. Wpływ antagonistów receptorów glutaminergicznych na przebieg choroby EAE

Wyniki eksperymentów dotyczące oddziaływania antagonistów receptorów glutaminergicznych na przebieg choroby EAE wykazały, że podanie zarówno amantadyny jak i memantyny statystycznie znamienne osłabiało deficyty neurologiczne i poprawiało stan fizjologiczny zwierząt w porównaniu do zwierząt EAE niepoddanych terapii. Zaobserwowano (1-2 dniowe) opóźnienie pojawiania się deficytów neurologicznych oraz skrócenie czasu trwania ostrej fazy choroby (o 1-2 dni). Nie zaobserwowano natomiast pozytywnego efektu terapeutycznego po podaniu zwierzętom EAE antagonistów receptorów metabotropowych mGluR G I (MPEP i LY 367385) (Sulkowski i in. 2013a, Sulkowski i in. 2013b).

3. Zmiany w transporcie glutaminianu i ekspresji transporterów (EAATs)

a) Wychwyty i uwalnianie glutaminianu

Pomiary wychwyty i uwalniania glutaminianu przeprowadzono na dwóch frakcjach błon komórkowych: synaptosomalnej - pochodzenia neuronalnego, oraz GPV - pochodzenia astrocytarnego. Oznaczenia wykonano technikami izotopowymi z użyciem znakowanego glutaminianu. Badania te wykazały u zwierząt EAE (w szczycie choroby - 12 d.p.i.) zwiększony wychwyty glutaminianu z przestrzeni zewnętrznej, zarówno w przypadku frakcji synaptosomalnej, jak i frakcji błonowej pęcherzyków pochodzenia astrocytarnego (GPV) odpowiednio o około 30% i 15% (Sulkowski i in. 2009). Zanotowano również zwiększone uwalnianie glutaminianu z obu frakcji (synaptosomalnej i GPV) o około 20% po depolaryzacji błon w obecności KCl (Sulkowski i in. 2009). Obserwowane zmiany w transporcie glutaminianu (wzrost zarówno wychwyty jak i uwalniania) sugerują, że podczas ostrej fazy EAE może dochodzić do zwiększenia poziomu glutaminianu w przestrzeniach synaptycznych. Zaburzenia te mogą prowadzić do ekscytotoksycznego uszkodzenia komórek w ośrodkowym układzie nerwowym.

b) Zmiany w ekspresji transporterów dla glutaminianu (EAATs)

Transport glutaminianu w ośrodkowym układzie nerwowym odbywa się za pomocą białek transportujących zlokalizowanych na błonach komórkowych zarówno neuronów

(transporter EAAC1) jak i astrocytów (transportery GLAST GLT-1). Jest to transport zgodny z gradientem jonów sodu (glutaminian przechodzi do komórki w kompleksie z jonami Na^+). Analizy poziomu ekspresji transporterów dla aminokwasów pobudzających EAATs na poziomie białka wykonano techniką Western blot, a poziom ekspresji mRNA oznaczono techniką RT-PCR. Oznaczenia wykonane na izolowanych frakcjach (synaptosomalnej i GPV) potwierdziły wzrost ekspresji białek transporterowych ekspresjonowanych na astrocytach (GLT-1), jak i na neuronach (EAAC1) o około 30 % w stosunku do kontroli w szczycie choroby EAE (12 d.p.i.). Ekspresja białka transportera GLAST była niezmienną (Sulkowski i in. 2009). Poziom ekspresji mRNA dla transporterów GLT-1 i GLAST oznaczany w różnych strukturach mózgowia (przodomózgowiu i mózdzku) wzrastał o 90-150% powyżej wartości kontrolnych i był skorelowany w czasie z nasileniem się deficytów neurologicznych u zwierząt EAE (Mitosek-Szewczyk i in. 2008). Nie zaobserwowano korelacji czasowej pomiędzy ekspresją mRNA i białek badanych transporterów. Odnotowano obniżenie ekspresji białka transportera GLAST (zarówno w mózdzku jak i w przodomózgowiu) oraz transportera GLT-1 (w mózdzku) pomiędzy 8-20 d.p.i. Natomiast w przodomózgowiu ekspresja białka GLT-1 wzrastała o 20-40% we wczesnych (4-6 d.p.i.) i późnych (20-25 d.p.i.) stadiach choroby, podczas gdy w szczycie EAE (8-12 d.p.i.) zaobserwowano 15-20% obniżenie ekspresji białka transportera GLT-1 (Mitosek-Szewczyk i in. 2008). Transporter GLT-1 jest głównym transporterem w przodomózgowiu, natomiast w mózdzku dominuje transporter GLAST. Obserwowane zmiany w ekspresji mRNA i białek badanych transporterów świadczą o ich zaangażowaniu w regulację podwyższonego poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu w przebiegu patologii EAE, oraz ochronę komórek OUN przed ekscytotoksycznością. Jednakże obniżenie ekspresji białka (pomimo wzrostu poziomu mRNA) dla głównego transportera GLT-1 w szczycie choroby może sugerować zaburzenie procesu regulacji poziomu glutaminianu w przestrzeniach synaptycznych.

4. Zmiany w ekspresji receptorów glutaminianergicznych:

Przeprowadzone technikami biologii molekularnej (Real time PCR) badania zmian ekspresji mRNA dla metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy I (mGluR 1 i mGluR 5) i receptorów NMDA potwierdziły wcześniej obserwowane zmiany w ekspresji w/w receptorów na poziomie białka przeprowadzone technikami Western blot. Obserwacje prowadzono zarówno w różnych fazach rozwoju choroby, jak również po poddaniu zwierząt EAE terapii z zastosowaniem antagonistów receptorów glutaminergicznych (memantyny, amantadyny, LY 367385i MPEP).

a) Ekspresja receptorów mGluR1

Poczynając od 8 d.p.i. u zwierząt EAE zaobserwowaliśmy postępujący w czasie wzrost ekspresji mRNA dla receptorów mGluR1, o około 300% w 25 d.p.i. Zmianom tym towarzyszył około 25% wzrost ekspresji mGluR1 na poziomie białka (Sulkowski i in. 2013b). Podanie amantadyny i memantyny powodowało obniżenie poziomu ekspresji mRNA mGluR1 o około 20% w porównaniu do zwierząt kontrolnych i o około 300% w porównaniu do nieleczonych zwierząt EAE w odpowiednich punktach czasowych. Obniżenie ekspresji mGluR1 na podobnym poziomie odnotowano we wszystkich badanych grupach czasowych zwierząt EAE (12, 10 i 25 d.p.i.). Podanie LY 377385 (antagonisty receptorów mGluR1) powodowało wzrost poziomu mRNA (ok. 300%) i podwyższenie poziomu białka (około 20%) dla mGluR1 w stosunku do zwierząt kontrolnych (Sulkowski i in. 2013b).

b) Ekspresja receptorów mGluR5

Ekspresja receptorów mGluR5 w modelu EAE wykazywała podobne tendencje zmian jak ekspresja receptorów mGluR1. Ekspresja mRNA mGluR5 wzrastała pomiędzy 12-25 d.p.i. o około 80% w stosunku do kontroli, natomiast na poziomie białka mGluR5 obserwowaliśmy w tym samym czasie około 20% wzrost. Podanie amantadyny i memantyny zmniejszało poziom ekspresji mRNA mGluR5 o około 20% w porównaniu do kontroli i o około 100% w porównaniu do zwierząt EAE w odpowiednim punkcie czasowym. Nie zanotowano zmian ekspresji mGluR5 na poziomie białka. Podanie MPEP (antagonisty mGluR5) powodowało wzrost ekspresji mRNA mGluR5 o około 40% w stosunku do kontroli, a na poziomie białka ekspresja wzrastała około 20% powyżej wartości kontrolnych (Sulkowski i in. 2013b).

c) Ekspresja receptorów NMDA

Poziom mRNA dla receptorów NMDA był o 20-30% niższy we wczesnych czasach po immunizacji (4-8 d.p.i.) i o 10-15% wyższy pomiędzy 20-25 d.p.i. Wzrost ekspresji receptorów NMDA na poziomie białka o około 10% był zauważalny tylko w późnych stadiach choroby (20-25 d.p.i.). Podanie amantadyny i memantyny obniżało poziom ekspresji receptorów NMDA w późnych stadiach choroby (20-25 d.p.i.), zarówno na poziomie mRNA

jak i białka w porównaniu do zwierząt EAE w odpowiednich punktach czasowych. Jednoczesne podawanie antagonistów receptorów NMDA (amantadyny i memantyny) z antagonistami mGluR G I (LY367385 i MPEP) nie miało dalszego zauważalnego wpływu na zmiany ekspresji mRNA i białek badanych receptorów (Sulkowski i in. 2013b).

5. Zmiany poziomu mRNA i białek wybranych czynników prozapalnych

a) Ekspresja cytokin i chemokin

Obserwacje mikroskopowe przy użyciu technik immunohistochemicznych z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał potwierdziły zwiększoną aktywację i proliferację mikrogleju i astrogleju w mózgach zwierząt w ostrej fazie EAE. Towarzyszyła temu zwiększona ekspresja prozapalnych cytokin (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) i kilku chemokin (fraktalkina, MIP-1 i MIP-3) (Sulkowski i in. 2013a). W grupach zwierząt EAE poddanych leczeniu przy użyciu amantadyny i memantyny zaobserwowano 20-30% obniżenie poziomu ekspresji mRNA cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Nie zaobserwowaliśmy natomiast zmian w ekspresji cytokin prozapalnych na poziomie białka po terapii zarówno z antagonistami receptorów NMDA (amantadyną i memantyną), jak i antagonistami mGluR G I (LY 367385 i MPEP) (Sulkowski i in. 2013a).

b) Ekspresja enzymów iNOS i COX-2

Podczas ostrej fazy EAE (12 d.p.i.) w mózgach zaobserwowano wzrost poziomu białka dwóch enzymów iNOS (o około 150%) i COX-2 (o około 100%) w porównaniu do kontroli (Sulkowski i in. 2013a). Terapia z zastosowaniem badanych antagonistów (amantadyny, memantyny, LY 367385 i MPEP) nie wpływała na poziom białka iNOS i COX-2. Enzymy te pełnią ważną rolę w regulacji metabolizmu glutaminianu i są powiązane z rozwojem procesu zapalnego. Stymulacja astrocytów, mikrogleju i makrofagów przez cytokiny prozapalne prowadzi do zwiększonej biosyntezy iNOS w mózgu (Parkinson i in. 1997). Zwiększony poziom ekspresji i aktywności COX-2 w OUN może prowadzić do wzrostu ekscytotoksycznych uszkodzeń oligodendrocytów, mieliny i uszkodzeń aksonów (Rose i in. 2004). Obserwowana przeze mnie, zwiększona ekspresja tych enzymów sugeruje,

iż podwyższony poziom glutaminianu może prowadzić do ekscytotoksycznych i zapalnych uszkodzeń mózgu w ostrej fazie EAE.

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania potwierdzają udział glutaminianu w patologii autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (EAE). Wyniki eksperymentów z zastosowaniem antagonistów receptorów glutaminianergicznych wskazują na zaangażowanie zarówno receptorów jonotropowych (NMDA) jak i metabotropowych (mGluR G I) w patologię EAE. Substancje wykazujące działanie antagonistyczne wobec receptorów NMDA (amantadyna i memantyna) działały neuroprotekcynie i w znacznym stopniu hamowały pojawianie się deficytów neurologicznych oraz poprawiały ogólną kondycję zwierząt. Nie zaobserwowano protekcyjnego wpływu antagonistów receptorów mGluR G I (LY 367385 i MPEP) na poprawę deficytów neurologicznych, zarówno, gdy podawano je oddzielnie, jak i w połączeniu z amantadyną i memantyną. Jednakże wszystkie testowane substancje brały udział w modulowaniu ekspresji mRNA i białka specyficznych receptorów glutaminianergicznych (NMDA, mGluR 1 i mGluR 5).

Zwiększony wychwyt i uwalnianie glutaminianu we frakcjach błonowych pochodzenia neuronalnego (synaptosomy) i astrocytarnego (frakcja GPV) oraz zwiększona ekspresja białka i mRNA dla transporterów glutaminianu (GLAST, GLT-1 i EAAC1) świadczą o włączeniu mechanizmów obronno-kompensacyjnych przeciwko wzrostowi poziomu glutaminianu w mózgach zwierząt EAE. Jednakże obserwowane równoległe obniżenie ekspresji białka głównego transportera GLT-1 w szczycie choroby (pomimo wzrostu poziomu mRNA) sugeruje zaburzenie procesu regulacji poziomu glutaminianu w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych.

W patologii EAE zaobserwowano zwiększoną proliferację i aktywację mikrogleju i astrocytów w mózgach chorych zwierząt, co świadczy o rozwoju procesu zapalnego. Towarzyszyła temu zwiększona ekspresja czynników prozapalnych: cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) i chemokin (fraktalkiny, MIP-1, MIP-3). Ponadto zaobserwowano zwiększony poziom białka dwóch enzymów iNOS i COX-2, które są powiązane z ekscytotoksycznymi i zapalnymi uszkodzeniami. Amantadyna i memantyna obniżały ekspresję czynników prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α , fraktalkiny, MIP-1, MIP-3) w ostrej fazie EAE, przyczyniając się do łagodzenia procesów zapalnych. Natomiast antagoniści mGluR G I (LY

367385 i MPEP) nie wykazywali wpływu na przebieg i modulację procesu zapalnego podczas EAE.

Literatura

- Adamchik Y., Baskys A. (2000) "Glutamate-mediated neuroprotection against N-methyl-D-aspartate toxicity: A role for metabotropic glutamate receptors." *Neuroscience* 99: 731-736.
- Biber, K., Laurie, D.J., Berthele, A., Sommer, B., Tolle, T.R., Gebicke-Harter, P.J., van Calker, D., Boddeke, H.W.G.M. (1999) "Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia." *J. Neurochem.* 72: 1671-1680.
- Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S. Kuhlmann T., Brück W. (2000) "Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation." *Brain* 123: 1174-1183.
- Bordli F and Ugolini A. (1999) "Group I metabotropic glutamate receptors: implication for brain diseases." *Prog. Neurobiol.* 59: 55-79.
- Bruno V., Battaglia G., Casabona G., Copani A., Caciagli F., Nicoletti F. (1998) "Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor-beta." *J. Neurosci.* 18: 9594-600.
- Bruno V., Copani A., Knöpfel T., Kuhn R., et al. (2000) "Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells." *Neuropharmacology* 39: 2223-2230.
- Choi D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." *Neuron* 1: 623-634.
- Choi D.W. (1994). "Calcium and excitotoxic neuronal injury." *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 747: 162-171.
- Conn J.P., Pin J.P. (1999) "Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors." *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-237.
- Cuzer, M.L., Hayes, G.M., Newcombe, J., Wooroofe, M.N. (1998). The nature of inflammatory components during demyelination in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 20: 203-209.
- Doble A. (1999) "The role of excitotoxicity in neurodegeneration disease: Implication for therapy." *Pharmacol. Ther.* 18: 163-221.
- Ganor Y., Besser M., Ben-Zakay N., Unger T., Levite M. (2003). "Human T cell express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration." *J Immunol.* 170: 4362-4372.
- Geurts JGG, Wolswijk G, Bö L, Van der Valk P, Polman CH, Troost D, Aronica E (2003). "Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis." *Brain* 126: 1755-1766.
- Groom A.J., Smith T., Turski L. (2003). "Multiple sclerosis and glutamate." *Ann N Y Acad. Sci.* 993: 229-275.
- Ikonomidou C. and Turski L. (1996) "Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant and adult rat brain: glutamate antagonists." *Metab. Brain Dis.* 11: 125-141.
- Kerschensteiner M., Stadelmann C., Buddeberg B.S., Merkler D., Bareyre F.M., Anthony D.C., Linington C., Brück W., Schwab M.E. (2004) "Animal model – Targeting experimental autoimmune encephalomyelitis lesions

to a predetermined axonal tract system allows for refined behavioral testing in an animal model of multiple sclerosis." *Am. J. Pathol.* 164, 1455-1469.

Klivenyi P., Kekesi K., Juhasz G., Vecsel L. (1997) "Amino acids concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." *Acta Neurol. Scand.* 95: 96-98.

Levin M.C., Lee S.M., Kalume F., Morcos Y., Dohn F.C. Jr, Hasty K.A., Callaway J.C., Zunt J., Desiderio D., Stuart J.M. (2002) "Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease." *Nat. Med.* 8: 509-13.

Matute C., Sanchez-Gomez M.V., Martinez-Millan L., Miledi R. (1997) "Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8830-8835.

McDonald J.W., Althomsons S.P., Hyrc K.L., Choi D.W., Goldberg M.P. (1998) "Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainite receptor mediated excitotoxicity." *Nat. Med.* 4: 291-297.

Meldrum B. S. (2000) "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." *J. Nutr.* 130: 1007- 1015.

Mills C.D., Fullwood S.D., Hulsebosch C.E. (2001) "Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury." *Exp. Neurol.* 170: 244-57.

Mitosek-Szewczyk K., Sulkowski G., Stelmasiak Z., Strużyńska L. (2008) „Expression of glutamate transporters GLUT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis.”*Neuroscience* 155: 45-52.(publikacja wchodząca w skład osiągnięcia zgłoszonego jako podstawa habilitacji)

Parkinson J.F., Mitrovic B., Merrill J.E. (1997) "The role of nitric oxide in multiple sclerosis." *J. Mol. Med.* 75, 174-86.

Perroy J., Raynaud F., Homburger V., Rousset M.C., Telley L., Bockaert J., Fagni L. (2008) "Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283: 6799-6805.

Pitt D., Werner P., Raine C.S. (2000) "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis." *Nat. Med.* 6: 67-70.

Rose J.W., Hill K.E., Watt H.E., Carlson N.G. (2004) "Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesions." *J. Neuroimmunol.* 149, 40-49.

Schoepp D.D., Jane D.E., Monn J.A. (1999). "Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors." *Neuropharmacol.* 38: 1431-76.

Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Kwiatkowska-Patzer B., Strużyńska L. (2009) "Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Folia Neuropathologica* 47: 327-337.(publikacja wchodząca w skład osiągnięcia zgłoszonego jako podstawa habilitacji)

Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Chalimoniuk M., Strużyńska L. (2013 a). "Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis." *J. Neuroim.* 261: 67-76. (publikacja wchodząca w skład osiągnięcia zgłoszonego jako podstawa habilitacji)

Sulkowski G., Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L. (2013 b) „Modulation of neurological deficits and expression of glutamate receptors during experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with selected antagonists of glutamate receptors.” *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 186068, pages 11, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/186068>. (publikacja wchodząca w skład osiągnięcia zgłoszonego jako podstawa habilitacji)

Takahashi J.L., Giuliani F., Power C., Imai Y., Young V.W. (2003) “Interleukin-1 beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity.” *Ann. Neurol.* 53: 588-595.

Thompson A.J., Bowling A.C. (2011) “Stwardnienie rozsiane” PZWL, Warszawa.

Verkhatsky, A., and Kirchoff, F. (2007) “NMDA receptors in glia.” *Neuroscientist* 13: 28-37.

Yoshioka A., Bacskai B., Pleasure D. (1996) “Pathophysiology of oligodendroglial excitotoxicity.” *J. Neurosci. Res.* 46, 427-437.

Ziemska E., Stafiej A., Lazarewicz J.W. (2003) “Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurons.” *Neurochem Int.* 43: 481-492.

Ziemska E., Lazarewicz J.W. (2006) “Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studies in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors.” *Acta Neurobiol. Exp.* 66: 301-309.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

a) Pozostałe informacje o dorobku naukowym:

Pozostałe informacje o dorobku naukowym znajdują się w *załączniku nr 6*.

b) Analiza bibliometryczna:

b.1) Prace oryginalne opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

- Ilość prac w piśmiennictwie posiadającym IF – 8
- Ilość prac w piśmiennictwie nieposiadającym IF – 2
- Ilość prac w suplementach czasopism posiadających IF – 1
- Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach – 18
- Sumaryczny IF: 8,432; punkty MNiSW: 87

b.2) Prace oryginalne opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

- Ilość prac w piśmiennictwie posiadającym IF – 13
- Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach – 32
- Sumaryczny IF: 34,132; punkty MNiSW: 268

b.3) Prace oryginalne opublikowane łącznie (w całym dorobku):

- Ilość wszystkich publikacji oryginalnych: 24
- Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:50
- Sumaryczny IF zgodnie z rokiem opublikowania:
IF: 42,564; punkty MNiSW: 365
- Liczba cytacji według bazy Web of Science (WoS): 190
- Indeks Hirscha opublikowanych publikacji według bazy Web of science (WoS): 9

Szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Bibliotekę IMDiK PAN znajduje się w *załączniku nr 8*.

c) Wyróżnienia i nagrody:

2003 r.- Nagroda Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich "The Henrykand Krystyna Wiśniewski Foundation", New York za rok 2002, za dorobek naukowy w dziedzinie neurochemii. Warszawa 24.V. 2003r.

2008 r.- Nagroda Dyrektora IMDiK im. M Mossakowskiego PAN za pracę z IF=3.814 opublikowaną w 2007 roku; autorstwa: Strużyńska L., Dąbrowska-Bouta B., Koza K., Sulkowski G. Inflammation-like glial response in lead-exposed immature rat brain. Toxicol. Sci, 2007, 95(1): 156-162.

2011 r.- Nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk za pracę zIF=3.601opublikowaną w 2010 roku, autorstwa: Grygorowicz T., Strużyńska L., Sulkowski G.,Chalimoniuk M., Sulejczak D. „Temporal expression of P₂X₇ purinergic receptor during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis.” Neurochemistry International 2010, 57, 823-829.

d) Dofinansowania udziału w konferencjach naukowych uzyskane w postaci grantów podróźnych:

1999 r. International Society for Neuroscience /European Society for Neurochemistry (ISN/ESN) Travel Awards na Konferencję International Society for Neuroscience /European Society for Neurochemistry w Berlinie, Niemcy.

e) Kierownik projektów grantowych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

1. N N401620038 pt. „Badania potencjału neuroprotekcynego antagonistów receptorów glutaminergicznyc (mGluR Gl i iGluR) w patogenezie alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego szczura.” 2010-2013 (36 miesięcy)

f) Główny wykonawca i wykonawca projektów grantowych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych oraz inne instytucje:

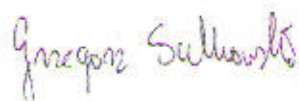
1. 2PO5F01326 pt. „Aktywacja mikrogleju mózgu szczura, jako jeden z mechanizmów neurotoksycznego działania ołowiu.” 2004-2006, (24 miesięcy), główny wykonawca.
2. N N401024635/B. pt. Rola ekscytotoksyczności w mechanizmie neurotoksycznego działania polichlorowanych bifenyli i bromowanych opóźniaczy spalania. 2008-2010 (36 miesięcy), główny wykonawca.
3. NN401619938 "Ocena oddziaływania nanocząstek srebrowych na ośrodkowy układ nerwowy szczura w badaniach in vitro i in vivo" 2010-2013 (36 miesięcy) główny wykonawca.
4. 2011/01/B/NZ5/01397 „Wpływ wzmożonej aktywności fizycznej o różnej charakterystyce na szlak NO/sCG/cGMP i śmierć neuronów dopaminergicznyc w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona”. 2011-2014 (30 miesięcy)- finansowany przez NCN- główny wykonawca.

g) Wygłoszone wykłady:

-„Metabolizm glutaminianu (GLU) w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego - relacje między astrocytem a neuronem.” Wykład dla studentów Studium Doktoranckiego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2005 r.

-„Zastosowanie technik izotopowych w badaniach podstawowych” Wykład dla studentów Studium Doktoranckiego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2011 r.

-Prowadzenie wykładów i cykli szkoleń z podstaw ochrony radiologicznej i zastosowania technik izotopowych dla pracowników Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, w Warszawie pracujących na stanowiskach w narażeniu na promieniowanie jonizujące (raz na 2 lata od 1996 roku) według programu szkoleń zatwierdzonego przez Prezesa Państwowej Agencji Atomistyki.



Grzegorz Sulkowski

Warszawa, 03. 12. 2013 r.