

## Autoreferat:

---

**Dorota Makarewicz**

Pracownia Farmakoneurochemii

Zakład Neurochemii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

**Warszawa, 2016**

**1. Imię i nazwisko:** Dorota Makarewicz

**2. Posiadane dyplomy:**

- Dyplom ukończenia studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie, 1997 rok. Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin pod kierunkiem prof. Stanisława Lewaka „Osmotyczne prekondycjonowanie nasion słonecznika”. Uzyskany tytuł: **magister biologii, specjalność – biologia ogólna.**
- Dyplom doktora nauk medycznych uzyskany w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, 2004 rok. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Neuroprotektoryjne działanie dantrolenu w modelowej asfiksji okołoporodowej w mózgu noworodków szczura”. Uzyskany stopień naukowy (z wyróżnieniem): **doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.**
- Dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Podyplomowe Studium Zarządzania Projektami”. Kolegium Zarządzania i Finansów, Szkoła Główna Handlowa. Warszawa, 2012 r.
- Dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Zarządzanie projektem badawczymi i komercjalizacja wyników badań”. Akademia Leona Koźmińskiego. Warszawa 2013 r.

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

- **1997 - 2006** – asystent w Pracowni Farmakoneurochemii, Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, w Warszawie.
- **2006 - 2014** – adiunkt w Pracowni Farmakoneurochemii, Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, w Warszawie.
- **2015 – obecnie** – Specjalista badawczo-techniczny w Pracowni Farmakoneurochemii, Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, w Warszawie. Zatrudnienie w niepełnym wymiarze godzin.
- **2013 –2016** – Zastępca Dyrektora ds. Operacyjnych, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

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

a. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Nowe perspektywy wykorzystania neuroprotektynowego potencjału ligandów receptorów glutaminianergicznych do leczenia i zapobiegania skutkom niedotlenienia mózgu u noworodków szczura.

b. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego/artystycznego: (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Opisane poniżej osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl prac oryginalnych przedstawiający możliwości ochrony mózgu przed skutkami niedotlenienia okołoporodowego w modelowej asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów. Podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny – biologia medyczna: jest następujący zbiór prac oryginalnych:

- I. **Makarewicz D**, Gadamski R, Ziembowicz A, Kozikowski AP, Wroblewski JT, Łazarewicz JW. Neuroprotective effects of the agonist of metabotropic glutamate receptors ABHD-1 in two animal models of cerebral ischaemia. 2006. Resuscitation. 68: 119-26. IF – 2,314

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczeń na modelu niedotlenienia okołoporodowego, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, przygotowaniu części rycin i napisaniu części publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

- II. **Makarewicz D**, Duszczyk M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. 2006. Neurochem Int. 48: 485-90. IF – 3,159

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczeń na modelu niedotlenienia okołoporodowego, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, przygotowaniu części rycin i napisaniu części publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

- III. **Makarewicz D**, Słomka M, Danysz W, Łazarewicz JW. Effects of mGluR5 positive and negative allosteric modulators on brain damage evoked by hypoxia-ischemia in neonatal rats. 2015. Folia Neuropathol. 53: 301-308. IF – 1,568

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczeń na modelu niedotlenienia okołoporodowego, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, przygotowaniu części rycin i napisaniu części publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

- IV. Słomka M, Kuszczak M, Łazarewicz JW, **Makarewicz D**. NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. 2014. Acta Neurobiol Exp. 74: 396-404. IF – 1,286

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i projektu badań, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, przygotowaniu części rycin i*

*manuskryptu. Zdobyłam także fundusze na realizację tych badań. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.*

- V. **Makarewicz D, Sulejczak D, Duszczyk M, Małek M, Słomka M, Lazarewicz J.** Delayed preconditioning with NMDA receptor antagonists in a rat model of perinatal asphyxia. 2014. Folia Neuropathol. 52: 270-84. IF – 1,568

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przeprowadzeniu doświadczeń na modelu niedotlenienia okołoporodowego, przygotowaniu części preparatów mikroskopowych, wykonaniu obliczeń i analizie statystycznej wyników, przygotowaniu rycin i napisaniu publikacji. Zdobyłam także fundusze na realizację tych badań. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.*

**Sumaryczny IF w/w prac: IF 9,895 MNiSW: 100 ptk.**

Ponadto w opisie niniejszego osiągnięcia wykorzystane zostały prace realizowane przez autorkę niniejszego opracowania, w celu pokazania ewolucji podejścia do problemu niedotlenienia okołoporodowego mózgu i związanych z tym potencjalnych możliwości terapeutycznych:

1. Gamdzyk M, **Makarewicz D**, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. Hypobaric Hypoxia Postconditioning Reduces Brain Damage and Improves Antioxidative Defense in the Model of Birth Asphyxia in 7-Day-Old Rats. 2014. Neurochem Res. 39:68-75.
2. Makarewicz D. Asfiksja okołoporodowa w klinice I laboratorium” 2007. Autorski program edukacyjny dla lekarzy nadawany w kanale TVN MED (obecnie [www.lekarskatv.pl](http://www.lekarskatv.pl))

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie prac objętych cyklem habilitacyjnym zawiera **Załącznik 8**.

### **c. omówienie celu naukowego/artystycznego powyższych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

#### **Problematyka i cele poznawcze.**

Nadrzędnym celem wszelkich biomedycznych badań przedklinicznych, wykonywanych w oparciu o modele zwierzęce lub modele *in vitro* jest lepsze poznanie patogenezы schorzeń i opracowanie nowych strategii terapeutycznych. W przedstawionych poniżej badaniach odległym celem praktycznym jest dokonanie postępu w neonatologii praktycznej, w terapii asfiksji okołoporodowej. Natomiast celem głównym przeprowadzonych badań przedklinicznych było sprawdzenie, czy obecny stan wiedzy pozwala na opracowanie metody bezpiecznej i skutecznej ochrony mózgów siedmiodniowych szczurów poddanych symulowanemu niedotlenieniu okołoporodowemu. Osiągnięcie celu głównego było możliwe przez realizację celów cząstkowych polegających na:

- zbadaniu neuroprotekcyjnego potencjału wybranych ligandów receptorów metabotropowych dla glutaminianu;
- zbadaniu możliwości stymulacji endogennych mechanizmów ochronnych, to jest indukcji tolerancji na niedotlenienie, poprzez prekondycjonowanie antagonistami receptorów NMDA.

## **Asfiksja okołoporodowa jako problem kliniczny.**

### ***Istota asfiksji okołoporodowej.***

Mimo szybkiego postępu neonatologii asfiksja okołoporodowa, zwana także zamartwicą, nadal jest zjawiskiem dość często spotykanym w praktyce klinicznej. Obecnie zamartwicę stwierdza się u 2-4 na 1000 żywo urodzonych, donoszonych noworodków (Loidl i wsp. 1998, Younkin, 1992). Ciężka asfiksja może doprowadzić do zgonu noworodka, lub być przyczyną uszkodzenia różnych organów. W ludzkiej patologii następstwem przebytej asfiksji okołoporodowej, mogą być zmiany wielonarządowe. Najgroźniejsze, to trwałe uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zamartwicy mogą też towarzyszyć zmiany ze strony układu oddechowego, krążenia, pokarmowego i moczowego. Zmiany te dotyczą 2-5% noworodków donoszonych i 60% wcześniaków z małą masą urodzeniową. W zależności od wieku ciążowego, 10-60% dzieci niedotlenionych umiera w pierwszym roku życia. U 25% stwierdza się trwałe uszkodzenie mózgu (Volpe 1987, Younkin 1992).

Zespół encefalopatii niedokrwiennie-niedotlenieniowej pojawia się u niemowląt z zamartwicą, które otrzymały od 0 do 3 punktów w skali Apgar powyżej piątej minuty życia. Drgawki mogą wystąpić w pierwszej dobie po urodzeniu, a zaburzenia ruchowe pod koniec 1 tygodnia życia (Michałowicz 1986). Uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), objawia się przewlekłymi zaburzeniami neurologicznymi, które stwierdza się u 25% dzieci przeżywających epizody zaburzeń krążenia mózgowego i niedotlenienia. Konsekwencją przebytej asfiksji okołoporodowej jest różnie nasilona encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna. W ciężkiej postaci, na skutek znacznych zaburzeń w rozwoju i śmierci mózgowej, dochodzi najczęściej do zgonu dziecka. Postać lekka charakteryzuje się niewielkimi zmianami napięcia mięśniowego oraz wygórowanymi odruchami i nie pozostawia konsekwencji w postaci zaburzeń rozwoju. Największy problem stanowią dzieci z tzw. średnią postacią encefalopatii niedokrwiennie-niedotlenieniowej. Postać ta podobnie jak lekka, może objawiać się nasilonymi zmianami napięcia mięśniowego, drgawkami, zmiennymi odruchami, jednak mogą jej towarzyszyć zmiany w EEG, obrzęk mózgu, upośledzone przepływy w naczyniach mózgowych, nieprawidłowy obraz MRI i tomografii komputerowej. Jeżeli objawy te utrzymują się krótko, można spodziewać się nieznacznych zaburzeń rozwoju dziecka w przyszłości, natomiast w sytuacji długotrwale utrzymującej się encefalopatii dochodzi do znacznego stopnia zaburzeń rozwoju z mózgowym porażeniem dziecięcym, zaburzeniami poznawczymi i/lub padaczką (Łosiowski 1990).

Przyczyna stanów zamartwiczych u noworodków nie jest dokładnie poznana. W końcowym okresie ciąży, w czasie porodu i u niemowląt okolice okołokomorowej i podkorowej istoty białej półkul mózgu i mózdzku są terenem szczególnie podatnym na uszkodzenia. Na pozostałe uszkodzenia ma wpływ szereg czynników, w tym charakter urazu i dojrzałość dziecka. Zmiany te ponadto cechują się ewolucją w czasie. U noworodków urodzonych o czasie dominują: selektywna martwica neuronów, uszkodzenia przystrzałkowe, stan marmurkowaty jąder podstawy i wzgórza oraz martwica wielotorbielowata (Dąmbska 1990). W ocenie tych zmian pomocne są: badanie EEG i badania obrazowe mózgu takie jak USG, MRI, tomografia komputerowa i badania izotopowe. Zapis EEG ułatwia ocenę dynamiki zmian po przebytej zamartwicy, a jeżeli wykonywany jest w 1 tygodniu życia, ma ponadto istotne znaczenie rokownicze. (Makarewicz 2007).

W diagnostyce uszkodzeń OUN często wykorzystywane jest badanie USG. Jest ono łatwo dostępne, nieinwazyjne i powtarzalne. Umożliwia rozpoznanie wad rozwojowych ośrodkowego układu nerwowego, krwawień okołokomorowych i dokomorowych oraz mięszu mózgu. Pozwala też na śledzenie ewolucji tych zmian w czasie. Warunkiem przydatności USG w rozpoznawaniu zmian niedotlenieniowych jest wykonywanie tego badania w sposób powtarzalny, gdyż zmiany po epizodzie niedotlenienia ujawniają się między 2 a 4 tygodniem życia. Zawały niedokrwiennie występują okołokomorowo, często w płatach czołowych i ciemieniowych. Przedstawiają one obraz ogniskowej martwicy skrzepowej ulegającej stopniowej resorpcji i bliznowaceniu. Zmiany martwicze powstają

także często na podłożu obrzękowym w okolicy okołokomorowej, a także w okolicach podkomorowych ze względu na zbyt słabe ukrwienie tych okolic (Behrman 1996).

Uszkodzenie istoty białej powstałe na skutek niedotlenienia często prowadzi do wytworzenia się jam, które są niewspółmiernie rozległe w stosunku do niewielkiego odczynu reparacyjnego w ich otoczeniu. Okołoporodowe niedotlenienie może być przyczyną rozległych uszkodzeń korowych prowadzących do zespołu ulegyii, czyli zmian stwardniająco-zanikowych. Rozległe ubytki neuronów w głębi rowków prowadzą do zmian bliznowatych z obfitym rozrostem gleju włóknistego, powodując, że zakręty kory stają się wąskie i przybierają na przekroju kształt grzybów, z powodu ich bliznowatego obkurczenia. Innym zespołem zmian niedokrwiennych są ogniskowe martwice w pniu mózgu, rozwijające się na skutek zatrzymania krążenia (Dąbmska 1990).

### ***Ogólna charakterystyka standardów postępowania z niedotlenionym noworodkiem.***

Klasyczna strategia postępowania z niedotlenionym noworodkiem często jest niewystarczająca i pomimo jej wdrożenia pozostają ślady przebytej zamartwicy w postaci deficytów neurologicznych i intelektualnych. Najlepszym rozwiązaniem w prewencji asfiksji okołoporodowej jest zastosowanie diagnostyki przed-, śród- i poporodowej. Istnieje szereg metod nadzoru płodu stosowanych podczas porodu, m.in. kardiokografia, okresowe osłuchiwanie akcji serca płodu, analiza krwi włośniczkowej, ocena profilu biofizycznego, pulsoksymetria, okołoporodowa rejestracja aktywności ruchowej czy test stymulacyjny płodu.

Istotne znaczenie ma także postępowanie lecznicze w przypadku ryzyka wystąpienia okołoporodowej encefalopatii niedokrwiennie-niedotlenieniowej. W takim przypadku rozważa się sposób rozwiązania ciąży. Poród drogami natury jest związany z biochemicznymi objawami niedotlenienia mózgu płodu. Jeżeli niedotlenienie to miało miejsce już wcześniej przed rozpoczęciem porodu, margines bezpieczeństwa może być niewystarczający. Poród cięciem cesarskim nie daje zaburzeń biochemicznych zwłaszcza w zasobach związków wysokoenergetycznych. Ponadto cięcie cesarskie skraca czas od momentu stwierdzenia ryzyka niedotlenienia płodu do czasu jego urodzenia z możliwością pełnej resuscytacji, ewentualnie reanimacji, którą przeprowadza się jeszcze na sali porodowej. W każdym przypadku niedotlenienia i niedokrwienia postępowanie lecznicze polega przede wszystkim na jak najszybszym przywróceniu dopływu krwi i dostawy tlenu do ważnych życiowo narządów (Makarewicz 2007).

Już przed laty wykazano, że poziom glikemii odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na niedotlenienie. Brak źródeł glukozy pogarsza stan ośrodkowego układu nerwowego, podczas gdy jej dowóz minimalizuje uszkadzający efekt niedotlenienia (Yager i wsp. 1991; Vanucci i wsp. 1994). Glikemię należy utrzymywać na poziomie fizjologicznym, gdyż nadmierna podaż glukozy powoduje wzrost poziomu toksycznych mleczanów odpowiedzialnych za kwasicę metaboliczną i nasilających niekorzystne zmiany w komórkach (Palmer i wsp. 1990, Gilland i wsp. 1996).

Podstawowe znaczenie dla ograniczenia skutków przebytego niedotlenienia ma zapewnienie optymalnej wymiany gazowej, normalizacja ciśnień parcjalnych gazów oddechowych we krwi tętniczej. W 2006 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zaakceptowała zastosowanie hipotermii leczniczej w zapobieganiu powikłań niedotlenienia noworodków donoszonych. Od kilku lat metoda ta jest także stosowana w niektórych polskich oddziałach intensywnej opieki neonatologicznej. Wykazano, że obniżenie temperatury ciała o 3-4 °C przez 72 godz. może zmniejszyć uszkodzenie mózgu i poprawić rokowanie dotyczące występowania następstw neurologicznych w tym mózgowego porażenia dziecięcego i padaczki (Nowacka-Gotowiec i Dunin – Wąsowicz – 2012). Jednak, mimo wielu różnych prób zastosowania neuroprotekcji farmakologicznej,

nadal nie opracowano skutecznej i bezpiecznej metody neuroprotekcji farmakologicznej, którą można byłoby stosować u ludzi.

### **Eksperymentalne aspekty asfiksji okołoporodowej.**

#### ***Model asfiksji okołoporodowej.***

Model asfiksji okołoporodowej opisany w niniejszym cyklu prac, jest odmianą powszechnie stosowanego modelu Levine'a (Levine, 1960). Został on zmodyfikowany i przystosowany do badań na oseskach szczurzych przez Rice'a (Rice i wsp. 1981). W modelu tym, siedmiodniowe szczury są poddawane ekspozycji na warunki hipoksyjne po uprzednim jednostronnym podwiązaniu i przecięciu tętnicy szyjnej wspólnej. Na podstawie różnych parametrów określających stopień rozwoju mózgu szczura, przyjmuje się, że mózg siedmiodniowego szczura odpowiada stopniem rozwoju mózgowi prawie terminowego, donoszonego noworodka. Dodatkowo, symuluje to warunki w jakich znajdują się noworodki przedterminowo urodzone, których nie w pełni rozwinięte mózgi są szczególnie narażone na procesy neurodegeneracyjne (Hagberg i wsp. 1997, Nyakas i wsp. 1996). Wybór tego modelu spośród kilku sposobów indukowania hipoksyjnego uszkodzenia mózgu u niedojrzałych szczurów wynika z faktu, że ma on wiele zalet, przy stosunkowo niewielkiej liczbie wad. Zabieg podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przy pewnej wprawie przeprowadza się szybko i precyzyjnie. Ponadto jest on stosunkowo mało inwazyjny i daje duże możliwości pozyskiwania materiału do opracowań statystycznych. Jednak model ten posiada także pewne niedoskonałości. W modelu asfiksji okołoporodowej uzyskujemy tylko jednostronne uszkodzenie mózgowia, przy braku uszkodzenia innych organów, co nie jest obserwowane w patologii ludzkiej. Nie ma też możliwości wielokrotnego pobierania próbek krwi od tego samego zwierzęcia, z powodu niewielkiej tylko ilości krwi którą można pozyskać w zasadzie tylko z rany dekapitacyjnej. Korzystną cechą tego modelu jest jednak fakt, że pozwala on badać odroczone skutki asfiksji okołoporodowej (Dell' Anna i wsp. 1991), nie powodując u badanych zwierząt ubocznych zaburzeń zdrowotnych. Stosowanie jako wewnętrznej kontroli strony mózgu nie objętej uszkodzeniem daje możliwość standaryzacji wyników. Mimo to obserwuje się dość znaczną zmienność wyników u poszczególnych zwierząt, co można korygować przez zwiększenie liczebności grup doświadczalnych. Model asfiksji okołoporodowej jest dobrze scharakteryzowany pod względem hemodynamiki, metabolizmu energetycznego i przemiany białek (Gilland i Hagberg, 1996, Hagberg 1997). Zapis EEG szczura poddanego eksperymentalnej hipoksji-ischemii jest zgodny ze wzorem otrzymanym w warunkach klinicznych po przebytej asfiksji okołoporodowej (Hellstrom-Westas i wsp. 1995). Powyższe cechy powodują, że model ten jest chętnie i dość szeroko stosowany na świecie.

#### ***Ekscytotoksyczność i uszkodzenie neuronów w ischemii mózgu.***

Od pierwszej połowy lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku wiadomo, że u podstaw patogenezy uszkodzenia neuronów wywołanej niedokrwieniem mózgu leży mechanizm ekscytotoksyczności. Jest to nadmierne lub długotrwałe pobudzenie jonotropowych receptorów dla pobudzających aminokwasów, zwłaszcza receptorów NMDA (Hertz 2008). Ekscytotoksyczność może rozwinąć się w wyniku działania endogennych lub egzogennych agonistów receptorów dla pobudzających aminokwasów. Kluczową rolę w rozwoju ekscytotoksyczności odgrywają zaburzenia energetyczne do których dochodzi w wyniku obniżonej podaży glukozy i tlenu co prowadzi do dysfunkcji i uszkodzenia mitochondriów. Uszkodzenie mitochondriów prowadzi do spadku produkcji ATP w neuronach i promuje szlaki prowadzące do neurodegeneracji (Urbańska i wsp., 1991; Turski i wsp., 1991). Niedobory energetyczne wpływają na zaburzenia potencjału błonowego, co z kolei wpływa na aktywację zależnych od potencjału kanałów sodowych i wapniowych oraz wytwarzania przez nie potencjałów czynnościowych uwrażliwiających neurony na glutaminian. Następuje zwolnienie zależnego od potencjału bloku magnezowego na receptorach NMDA.

Pierwszym etapem ekscytotoksyczności jest sekwencyjna aktywacja przez glutaminian receptorów AMPA a następnie NMDA. Pobudzenie receptora AMPA jest niezbędne do depolaryzacji błony komórkowej, co znosi blok magnezowy i powoduje otwarcie przepuszczalnego dla wapnia kanału receptora NMDA. Nadmierna aktywacja receptorów NMDA odgrywa kluczową rolę w procesach ekscytotoksyczności. W obecności jonów magnezu przy potencjale spoczynkowym błony przewodnictwo tego receptora jest bliskie zeru (Nowak i wsp. 1984). Warunkiem pełnej aktywacji receptora NMDA jest nie tylko usunięcie jonu magnezowego blokującego kanał, ale i związanie głównego agonisty – glutaminianu oraz koagonisty glicyny lub D-seryny do miejsca glicynowego. Receptor NMDA bez obecności tych związków nie ulega aktywacji (Danysz i wsp., 1998). Przedłużająca się depolaryzacja powoduje zaburzenie homeostazy jonów wywołanej wnikaniem jonów sodu, który indukuje bierny napływ chlorków oraz wody do neuronów. Proces ten prowadzi do pęcznienia komórek, uszkodzeń organelli, a nawet lizy (Rothman i wsp., 1985). Obrzmienie dendrytów i ciał neuronów przy zachowaniu prawidłowej morfologii aksonów i zakończeń presynaptycznych jest cechą charakterystyczną ich uszkodzenia ekscytotoksycznego. Po początkowym wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  wywołanego aktywacją receptorów NMDA dochodzi do spadku stężenia tych jonów do wartości fizjologicznej, na skutek wychwytu do naturalnych magazynów komórkowych. Jednak po kilku godzinach następuje wtórny przyrost stężenia jonów który nie jest hamowany przez antagonistów receptora NMDA, a może ulegać nasileniu przez zablokowanie błonowej pompy  $Na^+/Ca^{2+}$  lub odwrócenia kierunku jej pracy.

Innym elementem mechanizmów ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów może być nadmierne pobudzenie receptorów metabotropowych dla glutaminianu (mGluRs) (Martin i wsp., 1992). Ekscytotoksyczność niesie za sobą także ryzyko aktywacji innych mechanizmów prowadzących do śmierci neuronów. Szczegółowa charakterystyka procesów produkcji wolnych rodników, uwalniania tlenu azotu, aktywacji mikrogleju oraz procesów zapalnych prowadzące do śmierci neuronów wykraczają poza ramy niniejszego opracowania.

### ***Strategie terapeutyczne oparte na neuroprotekcji z uwzględnieniem badań na noworodkowych modelach zwierzęcych.***

Od kilku dziesięcioleci trwają próby opracowania skutecznej strategii terapeutycznej w udarze mózgu i pochodnych schorzeniach niedokrwiennych ośrodkowego układu nerwowego. Trwają testy strategii terapeutycznych polegających na podawaniu leków neuroprotektynnych, które chronią neurony hamując kaskadę zjawisk wiodących do nekrotycznej i apoptotycznej śmierci komórek. Jednak do dnia dzisiejszego nie opracowano bezpiecznego i skutecznego leku który mógłby być stosowany w klinice w leczeniu udarów. Podobnie jest w przypadku związków o potencjale neuroprotektynnym w chorobach neurodegeneracyjnych. Liczne substancje, w tym antagoniści receptorów NMDA, mimo zachęcających efektów neuroprotektynnych w badaniach przedklinicznych, nie sprawdziły się w testach klinicznych (Cheng i wsp., 2004). Wśród przyczyn tego stanu rzeczy wymienia się między innymi niekompatybilność modeli zwierzęcych z realiami klinicznymi, oraz niewłaściwe prowadzenie terapii w testach klinicznych: zbyt późne wdrożenie leczenia i stosowanie zbyt niskich dawek potencjalnych substancji neuroprotektynnych (Cheng i wsp., 2004). Niewątpliwie słusznymi są poglądy wskazujące na to, że nasza wiedza na temat patogenezы udarów jest wciąż zbyt ograniczona, a rozwój nowych strategii terapeutycznych wymaga wszechstronnego poznania i zrozumienia różnorodności mechanizmów niedokrwienego uszkodzenia mózgu prowadzącego do śmierci neuronów (Doyle i wsp., 2008).

Poszukiwania leków neuroprotektynnych, hamujących kaskadę procesów prowadzących do śmierci neuronów w niedotlenionym mózgu noworodków wciąż trwają, ale mimo intensywnych badań brak leku, który mógłby być z powodzeniem stosowany w klinice neonatologicznej. Ponadto farmakologiczną terapię zamartwicy noworodków ukierunkowaną na neuroprotekcję komplikuje szczególna wrażliwość niedojrzałego mózgu na neurotoksyczne i proapoptotyczne działanie wielu

substancji lub działań o udowodnionym potencjale neuroprotekcynym, wliczając antagonistów receptorów NMDA (Ikonomidou, 2009, Olney i wsp. 2002). Jednak zdaniem innych badaczy silne neurotoksyczne działanie na rozwijający się mózg antagonistów receptorów NMDA o dużym powinowactwie do kanału nie dotyczy memantyny – antagonisty o niskim powinowactwie (Manning i wsp. 2008). Ponadto pozostała niedostrzeżona przez szersze kręgi naukowców badających mechanizmy neuroprotekcji pionierska publikacja Tremblay i wsp. 2000, w której pokazano, że na hodowlach neuronów neuroprotekcynne działanie bezkompetycyjnych antagonistów receptora NMDA może polegać nie tylko na bezpośrednim hamowaniu nadmiernej aktywacji tego receptora, ale też na prekondycjonowaniu i indukcji tolerancji na różne stresory o działaniu proapoptotycznym. Brak było jednak potwierdzenia tych obserwacji w badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym. Przytoczone obserwacje wydawały się wskazywać na celowość badania przedklinicznego tych nowych możliwości wykorzystania antagonistów receptorów NMDA, a zwłaszcza leku - memantyny w terapii asfiksji okołoporodowej.

W ostatnich latach leki oraz związki o potencjale neuroprotekcynym w różnych punktach uchwytu były testowane w modelach zwierzęcych w tym także noworodkowych (Zalewska i wsp. 2015). Antagonista receptora AMPA - topiramát wykazywał działanie przeciwdrgawkowe oraz działał ochronnie na istotę białą a także poprawiał funkcje motoryczne (Johnston i wsp. 2011). Ponadto dotychczas przeprowadzone badania na małej grupie ludzkich noworodków wskazują na wysokie bezpieczeństwo tego leku, jednak badania te ograniczone były jedynie do zbadania właściwości farmakokinetycznych tego leku. Erytropoetyna – endogenna cytokina regulująca produkcję erytrocytów, działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, antyapoptyczne, neurotroficzne i stymulujące neurogenezę, posiadała także działanie neuroprotekcynne w zwierzęcym modelu noworodkowym. Zaobserwowany efekt był zależny od dawki leku. W badaniach na zwierzętach opisano także korzystny efekt komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Obecnie w USA przeprowadzane jest badanie porównujące zastosowanie komórek macierzystych z krwi pępowinowej u noworodków z encefalopatią niedokrwienno-niedotlenieniową stosowanych w połączeniu z hipotermią lub bez hipotermii (Johnston i wsp. 2011, Bonifaccio 2011). Związek o silnym działaniu antyoksydacyjnym – melatonina, również wykazuje działanie neuroprotekcynne. U noworodków szczurzych z uszkodzoną istotą białą stwierdzono, że melatonina wspomaga dojrzewanie oligodendrogleju. Obecnie trwają badania dotyczące zastosowania melatoniny łącznie z hipotermią (Bonifaccio 2011). Leczenie kortykosteroidami jest szeroko stosowane w zapobieganiu zakażeniom noworodka, niewydolności oddechowej, oraz przewlekłych chorób płuc po urodzeniu. Ponadto zmniejsza ono możliwość krwawienia dokomorowego. Podanie deksametazonu gryzoniom przed symulowanym niedotlenieniem okołoporodowym zapobiegało ubytkom neuronów i było skorelowane z poprawą zdolności uczenia się. Deksametazon może więc być uważany za obiecujący lek neuroprotekcynny w asfiksji okołoporodowej (Chen i wsp. 2012). Kanabinoidy są także badane pod kątem działania neuroprotekcynnego w modelach niedokrwienia mózgu. Na przykład, kanabidiol zmniejszał śmierć neuronów u noworodków prosiąt bez poważnych krótkoterminowych skutków ubocznych (Alvarez i wsp. 2008). Czynniki troficzne takie jak BDNF czy GDNF wykazały ochronne działanie wobec neuronów w niedokrwiennych modelach zwierzęcych, także u noworodków. Jednak z uwagi na słabą przenikalność przez barierę krew-mózg substancje te musiałyby być podawane drogą domózgową, co mogłoby wpływać na ich bezpieczeństwo. (Almili i wsp. 2000; Katsuragi i wsp. 2005).

#### **Zastosowanie antagonistów receptora NMDA.**

Szczególnego rozważenia wymaga stosowanie antagonistów receptorów NMDA dla zahamowania ekscytotoksyczności i uzyskania neuroprotekcji w klinice. Należy pamiętać o kluczowej roli neurotransmisji pobudzającej w mózgu, m. in. w mechanizmach plastyczności, w tym plastyczności rozwojowej (Albensi, 2007). Mimo wielu obiecujących wyników w różnych modelach zwierzęcych, tylko niewielka grupa tych związków przeszła pomyślnie pierwszą fazę badań klinicznych. Zaburzenie

tych funkcji przez antagonistów receptorów jonotropowych dla glutaminianu takich jak MK-801 czy fencyklidynę prowadzi do poważnych efektów niepożądanych, które spowodowały, że te związki zostały wycofane z dalszych etapów badań klinicznych. Powyżej wspomniano o ich działaniu proapoptycznym na rozwijający się mózg (Ikonomidou, 2009, Olney i wsp. 2002). W przypadku antagonistów receptorów NMDA o niskim powinowactwie do kanału wapniowego takich jak memantyna czy amantadyna mimo zaobserwowania tylko odwracalnych zmian nie prowadzących do uszkodzenia neuronów, ich zastosowanie praktyczne ogranicza się do terapii objawowej demencji m. in. typu alzheimerowskiego oraz w chorobie Parkinsona (Danysz i Parsons, 2003).

### **Zastosowanie ligandów receptorów metabotropowych.**

Dotychczas poznano i sklonowano 8 typów receptorów metabotropowych (Pałucha, 2000). Zakwalifikowano je do trzech grup mGluR: I, II i III, zgodnie z homologią sekwencji aminokwasowej, profilem farmakologicznym oraz typem szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (Conn i wsp., 1997). Receptory te występują w różnych strukturach mózgu. Receptory mGluR grupy I (mGluR1 i mGluR5) zlokalizowane są głównie postsynaptycznie a ich aktywacja odbywa się w sytuacji, kiedy występuje nadmiar glutaminianu w przestrzeni synaptycznej. Receptory metabotropowe grupy II (mGluR2 i 3) oraz III (mGluR4, 6, 7 i 8) występują głównie presynaptycznie (Danysz, 2001; Pałucha, 2000). Ich stymulacja prowadzi do zahamowania cykazy adenylowej i spadku poziomu cAMP w komórce (Schoepp i wsp., 1999). Receptory mGluR grupy I są sprzężone za pośrednictwem białka G z fosfolipazą C, której aktywacja, w wyniku pobudzenie tych receptorów wywołuje syntezę i uwalnianie wtórnych przekaźników: 1,4,5-trisfosforanu inozytoli (IP3) oraz diacyloglicerolu, (DAG) na skutek rozszczepienia cząsteczki fosfatydylo-inozytolo(4,5)bifosforanu. IP3 uwalniany do cytoplazmy wiąże się ze swoim receptorem na powierzchni siateczki śródplazmatycznej, wywołując uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych, głównie z siateczki śródplazmatycznej za pośrednictwem receptorów rianodynowych w mechanizmie tzw. wywołanego przez wapń wyrzutu wapnia (ang. *Calcium induced calcium released, CICR*) (Salinska, Łazarewicz 2012).

DAG z kolei w obrębie cytoplazmy powoduje aktywację i translokację do błony kinazy białkowej C, która fosforyluje m.in. receptory NMDA, ograniczając w istotnym stopniu ich desensytyzację. Ponadto, aktywacja receptorów mGluR grupy I prowadzi do hamowania przewodnictwa kanałów potasowych, co prowadzi do zwiększenia pobudliwości neuronów (Bond i wsp., 1998, 2000).

Wspólną cechą receptorów metabotropowych jest brak bezpośredniego związku z kanałami jonowymi. Ich funkcja w ośrodkowym układzie nerwowym polega na regulacji uwalniania neuroprzekaźników, w tym także kwasu glutaminowego i GABA jak również kontroli pobudliwości neuronalnej (Anwyl 2000; Cartmell i Schoepp 1997, Conn i Pinn 1997). Poznanie roli receptorów mGluR w regulacji aktywności układu glutaminianergicznego spowodowało, że ich ligandy bardzo szybko wzbudziły duże zainteresowanie jako substancje o potencjalnym działaniu neuroprotektynym. Istotne znaczenie miał też mechanizm działania receptorów mGluR. Brak bezpośredniego wpływu na kanały jonowe wskazywał na niższe prawdopodobieństwo występowania działań niepożądanych. Badania przedkliniczne wykazały, że ligandy receptorów metabotropowych mogą być celem farmakoterapii w leczeniu schorzeń neurologicznych i neurodegeneracyjnych, udarów i urazów mózgu oraz epilepsji. Pojawiły się liczne doniesienia o możliwości wykorzystania blokerów receptorów grupy I mGluR (Bordi i Ugolini 1999, Nicoletti i wsp. 1999, Pellegrini-Giampietro i wsp. 1999). Te propozycje opierały się na rozumowaniu, że aktywacja receptorów grupy I wywołuje efekty pobudzające. Nadmierna stymulacja tych receptorów wiąże się więc z neurotoksycznością, natomiast zahamowanie aktywności tych receptorów powinno mieć działanie neuroprotektynne. Jednak dane literaturowe pokazują, że niektóre związki będące agonistami receptorów metabotropowych grupy I także posiadają pewien potencjał neuroprotektynny. Adamchik i Baskys (2000) wykazali, że kwas 1S,3R1-aminocyklopentano-trans-1,3-dikarboksylowy (1S-3R-ACPD) zapobiegał śmierci komórek w organotypowych hodowlach skrawków hipokampa w stężeniu 100

$\mu\text{M}$ , ale nie  $50 \mu\text{M}$ . ACPD w sposób znamieny statystycznie zapobiegał wzrostom stężenia jonów wapnia w neuronach wywołanym przez glutaminian lub NMDA (Pizzi i wsp. 1996). Za neuroprotektynym działaniem agonistów I grupy mGluR przemawiają także efekty kwasu kwiskwalowego, który hamował neurotoksyczność NMDA w skrawkach kory mózgowej szczura (Pizzi i wsp. 1996). W modelu czasowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczura, selektywny agonista receptorów mGluR5 – (R,S)-2-chloro-5-hydroksyfenylglicyna (CHPG) (Bao i wsp. 2001) podawany dokomorowo 15 min. po zamknięciu tętnicy redukował obszar udaru niedokrwiennego o 44%. Efekt neuroprotektyny zależał od podanej dawki, więc pobudzenie receptorów mGluR5 wywiera w tym modelu działanie neuroprotektynne. Sugeruje się, że neuroprotektyny efekt CHPG może być związany z jego działaniem antyapoptotycznym (Allen i wsp. 2000). Wykazano również, że selektywny agonista tej grupy receptorów DHPG u siedmiodniowych noworodków szczurzych, hamował wywołane przez NMDA uwalnianie jonów  $\text{OH}^-$ , co może świadczyć o tym, że stymulacja receptorów grupy I mGluR może ochraniać mózg młodych zwierząt (Cambonie i wsp. 2000). Przegląd literatury dotyczącej proponowanych strategii terapeutycznych z użyciem ligandów receptorów metabotropowych dla glutaminianu w różnych modelach patologii niedokrwienno-niedotlenieniowej mózgu zwierząt dorosłych i noworodków wskazał na duży zamęt. W literaturze przedmiotu często spotyka się sprzeczne doniesienia lub informacje, o działaniu neuroprotektynnym zarówno agonistów jak i antagonistów tych samych receptorów. W badaniach prezentowanych w tym Autoreferacie po scharakteryzowaniu działania niespecyficznego agonisty GI mGluR, działającego także pobudzająco na GII i GIII mGluR, skupiłam się na ocenie potencjału neuroprotektynnego antagonistów GI mGluR, z podziałem na antagonistów mGluR1 i mGluR5 w szczurzym modelu encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej noworodków.

### **Badania własne.**

Uzasadnieniem do podjęcia przedstawionych poniżej badań był fakt, że podobnie jak w przypadku udarów mózgu u osób dorosłych, także w standardach terapii asfiksji okołoporodowej w klinice neonatologicznej brak jest skutecznych i bezpiecznych metod neuroprotektyny farmakologicznej. Opisanie poniżej publikacje wskazane jako osiągnięcie naukowe pokazują nowe spojrzenie na możliwości ochrony mózgu przed skutkami niedotlenienia okołoporodowego w modelu siedmiodniowych szczurów.

### ***Potencjał terapeutyczny wybranych ligandów receptorów grupy I mGluR w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej.***

W założeniach, badania związane z receptorami metabotropowymi oraz ich ligandami o potencjale neuroprotektynnym były obiecujące. Oczekiwano, że odpowiednio dobrane ligandy ograniczą w znacznym stopniu lub wyeliminują działania niepożądane obserwowane w przypadku antagonistów receptora NMDA. Pierwsze trzy prace oryginalne (I, II, III) dotyczą dalszych poszukiwań potencjału neuroprotektynnego wybranych ligandów receptorów metabotropowych dla glutaminianu. W opisanych poniżej badaniach skupiono się na ligandach receptorów mGluR grupy I ponieważ są one sprzężone z receptorami NMDA i pośredniczą w mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. Hamowanie tych receptorów powinno objawiać się zaobserwowaniem efektu neuroprotektynnego.

Ligandy receptorów metabotropowych grupy I (GI) były testowane w różnych modelach niedokrwienia mózgowia zarówno u zwierząt dorosłych jak u noworodków. Jednak dane literaturowe prezentują rozbieżne dane z wyników badania efektów neuroprotektynnych zarówno agonistów jak i antagonistów w różnych układach doświadczalnych na różnych gatunkach zwierząt i o różnym stopniu dojrzałości (dojrzałe vs. noworodki). W literaturze dominują doniesienia o neuroprotektynnym działaniu antagonistów GI mGluR. Na przykład badania przy użyciu MRI wykazały, że dokomorowe podanie szczurom antagonisty mGluR1 – AIDA hamuje rozwój lezji w modelu traumatycznego urazu mózgu a także odwraca deficyty behawioralne i zaburzenia pamięci

(Lyeth i wsp. 2001). Dokomorowe podanie antagonisty mGluR5 - MPEP w dawce do 250 nmoli w 15 min. po okluzji tętnicy redukowało objętość udaru niedokrwiennego o 61%. Zaobserwowany efekt neuroprotekcyny był zależny od dawki. MPEP okazał się także skuteczny w szczurzym modelu czasowego zamknięcia tętnicy mózgowej środkowej (Bao i wsp. 2001). Rzadziej opisywano neuroprotekcynne działanie agonistów receptorów metabotropowych grupy I. Cambonie i wsp. (2000), wykazali że aktywacja receptora mGluR5 przez DHPG hamowała ekscytotoksyczność wywołaną przez glutaminian. Efekt ten zaobserwowano tylko w niedojrzałych mózgach. Nie został on jednak zaobserwowany w mózgach po 21 dniu życia (Cambonie i wsp. 2001). Bao i wsp. (2001) wykazali, że zarówno antagoniści (MPEP) jak i agoniści (CHPG) mGluR5 mają działanie neuroprotekcynne w ogniskowym uszkodzeniu mózgu u szczura.

W opisanych poniżej badaniach własnych, ligandy receptorów metabotropowych grupy I podawane były dootrzewnowo przed lub po przeprowadzeniu niedotlenienia okołoporodowego. Badania przy użyciu różnych ligandów receptorów metabotropowych grupy I testowane były w różnych układach doświadczalnych. Zbiorcze zestawienie badanych związków, dawek, dróg i czasu ich podania przedstawia poniższa tabela.

Nazwa ligandu	Dawka i droga podania	Czas podania
ABHxD-1	30 mg/kg, dootrzewnowo; 7,5 µg, dokomorowo	30 min. po H-I
MTEP	1,25 mg/kg; 2,5 mg/kg; 5,0 mg/kg dootrzewnowo	Bezpośrednio po H-I w 3 dawkach co 2 godziny
EMQMCM	1,25 mg/kg; 2,5 mg/kg; 5,0 mg/kg dootrzewnowo	Bezpośrednio po H-I w 3 dawkach co 2 godziny
ADX47273	5,0 mg/kg; 10, 0 mg/kg; 30 mg/kg dootrzewnowo	10 min. po H-I
Fenobam	10,0 mg/kg; 20,0 mg/kg dootrzewnowo	10 min po H-I

Dawki testowanych ligandów ustalono na podstawie przeprowadzonych wcześniej badań pilotowych, lub na podstawie informacji uzyskanych od osób które brały udział w syntezie badanych substancji. Celem przeprowadzonych badań było określenie neuroprotekcynnego potencjału wybranych agonistów receptorów metabotropowych dla glutaminianu w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej. Poniżej opisano wyniki uzyskane w pracach I, II i III stanowiących pewien zamknięty cykl tematyczny.

- I. Makarewicz D, Gadamski R, Ziembowicz A, Kozikowski AP, Wroblewski JT, Lazarewicz JW. Neuroprotective effects of the agonist of metabotropic glutamate receptors ABHxD-1 in two animal models of cerebral ischaemia. 2006. Resuscitation. 68: 119-26.

Przytoczone powyżej dane literaturowe były punktem wyjścia do sprawdzenia, czy zsyntetyzowany przez grupę naukowców z Georgetown University (USA) nieselektywny agonista receptorów metabotropowych grupy I mający także agonistyczny wpływ na receptory metabotropowe grup II i III. – kwas 2-aminobicyklo[2.1.1]heksa-2,5-dikarboksylowy (**ABHxD-I**), może mieć działanie neuroprotektoryjne w modelu niedotlenienia okołoporodowego (Kozikowski i wsp. 1998). Przeprowadzone wstępnie przez naukowców z Georgetown badania *in vitro* wykazały, że związek działał ochronnie na skrawki mózgu myszy po podaniu NMDA a także po odcięciu podaży glukozy i tlenu oraz po podaniu  $\beta$ -amyloidu. Te wstępne wyniki skłoniły nas do sprawdzenia, czy neuroprotektoryjne działanie tego agonisty zostanie zaobserwowane w modelu asfiksji okołoporodowej. ABHxD-I był podawany w iniekcji dootrzewnowej w dawce 30 mg/kg lub w iniekcji domózgowej w dawce 7,5  $\mu$ g., 30 min. po przeprowadzeniu hipoksji-ischemii. Uszkodzenie mózgu oceniano 14 dni po zabiegu przez porównanie świeżej masy półkul. Bezpośrednio po iniekcji przeprowadzono także pomiary temperatury rektalnej, aby sprawdzić, czy ewentualne działanie ochronne ligandu można wiązać z wywołaniem hipotermii, która jak powszechnie wiadomo, ma działanie neuroprotektoryjne. Zaobserwowany efekt neuroprotektoryjny wystąpił zarówno po podaniu dootrzewnowym jak i po podaniu domózgowym, przy czym silniejszy efekt zaobserwowano po podaniu dootrzewnowym. Wyniki tych badań wskazują, że efekt neuroprotektoryjny ABHxD-I można wiązać z działaniem bezpośrednim ligandu na neurony, a nie z wpływem na temperaturę ciała badanych zwierząt. Uzyskane wyniki pokazują ponadto, że ABHxD-I może łatwo penetrować barierę krew-mózg 7-dniowych szczurów, a dzięki bardziej równomiernej dystrybucji do wszystkich rejonów mózgu po podaniu dootrzewnowym, efekt ten może mieć potencjalnie większe znaczenie terapeutyczne niż w przypadku iniekcji domózgowych. Poza tym podanie leku drogą iniekcji dootrzewnowej jest bezpieczniejsze, co może mieć istotne znaczenie praktyczne. ABHxD-I podany obwodowo nie miał żadnego wpływu na uszkodzenie neuronów piramidalnych w CA1 hipokampa dorosłych myszokoczków w modelu 3-min. globalnej ischemii mózgu, natomiast podany dokomorowo miał działanie neuroprotektoryjne, co ukazuje słabe przenikanie ABHxD-I przez dojrzałą barierę krew - mózg. Pomiary temperatury mózgowia pokazały jednak, że działanie neuroprotektoryjne ABHxD-I podanego myszokoczkowi domózgowo można częściowo wiązać z obniżeniem temperatury ciała i mózgu tych zwierząt.

Dokładne określenie mechanizmu molekularnego neuroprotektoryjnego działania ABHxD-I jest trudne ze względu na brak selektywności w działaniu tego liganda mGluR. Poza aktywacją GI mGluR, ABHxD-I może bowiem stymulować receptory metabotropowe grup II i III, co może dawać efekt neuroprotektoryjny. Np. LY379268, silny, selektywny agonista II grupy mGluR podany w dawce 10 mg/kg działał neuroprotektoryjnie u myszokoczka w modelu globalnej ischemii. Związek ten podany w 30 min. po zamknięciu tętnicy szyjnej zapobiegał utracie neuronów w sektorze CA1 hipokampa (Bond i wsp. 1999). Podobne efekty wywoływał LY354740 selektywny agonista mGluR grupy II w dawce 50 mg/kg (Bond i wsp. 1998). Miał on działanie neuroprotektoryjne u myszokoczków w modelu obustronnego zamknięcia tętnicy szyjnej przez 3 min. (ale nie przez 4 lub 5 min.) (Iversen i wsp. 1994; Keyvani i wsp. 2001).

Jakkolwiek samo istnienie zaobserwowanego w tej pracy efektu ochronnego ABHxD-I jest niewątpliwe, to jednak w świetle sprzecznych doniesień dotyczących neuroprotektoryjnego działania różnych ligandów GI mGluR nie można jednoznacznie stwierdzić, że zaobserwowany efekt neuroprotektoryjny jest bezpośrednio związany ze stymulacją receptorów GI mGluR. Jest on związany raczej ze stymulacją receptorów metabotropowych grupy II i być może III. W przedstawionej poniżej pracy II antagonistą mGluR1 EMQMCM w modelu asfiksji okołoporodowej miał działanie neuroprotektoryjne. Trudno więc zakładać, że zarówno agoniści jak i antagoniści tego samego receptora będą wywierały podobne działanie. Od czasu opublikowania pracy Makarewicz i wsp. 2006, w literaturze nie pojawiły się doniesienia na temat innego możliwego działania ABHxD.

*Pomimo zaobserwowanego działania neuroprotekcijnego ABHxD-I, przedstawione fakty wskazują, że ten związek nie jest dobrym kandydatem do dalszych badań we wskazaniu związanym z leczeniem skutków zamartwicy u noworodków. Wynika to z niejasnego mechanizmu działania oraz z udowodnionego, działania neurotoksycznego innych agonistów receptorów metabotropowych grupy I. Nieselektywni agonści mGluR różnych grup mogą wywołać bliżej nieokreślone w skutkach działanie na rozwijający się mózg. To dyskwalifikuje tę grupę związków jako kandydatów na produkt leczniczy stosowany we wskazaniu leczenia i zapobiegania skutkom zamartwicy.*

- II. Makarewicz D, Duszczyk M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. 2006. *Neurochem Int.* 48: 485-90.

Jak wspomniano wyżej, antagoniści receptorów metabotropowych grupy I mogłyby być rozważane jako potencjalne leki (Bruno i wsp. 2001), jednak sprzeczne i niejednoznaczne doniesienia wymagały dalszych badań w tym zakresie. Kolejnym krokiem było więc testowanie właściwości neuroprotekcyjnych niekompetycyjnych antagonistów receptorów metabotropowych grupy I. Były nimi:

EMQMCM – metanosulfonian (3-etylo-2-metylocholina-6-ylo)-(4-metoksy-cykloheksylo)-metanonu – antagonistą mGluR1, który został zsyntetyzowany w laboratoriach Merz Pharmaceuticals w Niemczech,

oraz

MTEP – [(2 metylo-1,3 tiazol-4-yl) etynyl] piridyna – antagonistą mGluR5.

Podobnie jak w przypadku ABHxD-I, potencjał neuroprotekcyny był badany zarówno w modelu asfiksji okołoporodowej, jak i w modelu globalnej ischemii mózgu u dorosłych myszokoczków. Oba związki były podawane drogą dootrzewnową w trzykrotnych iniekcjach co 2 godziny tuż po zakończeniu hipoksji-ischemii lub ischemii globalnej. Od zakończenia ischemii monitorowana była także temperatura rektalna.

Wyniki badań przeprowadzonych na szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej wykazały, że efekt neuroprotekcyny zaobserwowano w przypadku podania antagonisty receptorów mGluR1 – EMQMCM. Ponadto w modelu asfiksji okołoporodowej wpływ EMQMCM na temperaturę rektalną badanych zwierząt był niejednoznaczny. Natomiast badania z użyciem modelu globalnej ischemii u myszokoczków ujawniły działanie neuroprotekcyjne EMQMCM podanego w najwyższej dawce (5,0 mg/kg), czemu towarzyszyło obniżenie temperatury mózgu, co może świadczyć o udziale hipotermii w działaniu neuroprotekcyjnym tego związku. Inną różnicą w działaniu obu badanych antagonistów GI mGluR w zastosowanych zwierzęcych modelach niedotlenienia/niedokrwienia mózgu, było neuroprotekcyjne działanie antagonisty mGluR5 – MTEP w modelu odwracalnej ischemii przodomózgowia indukowanej obustronnym zaciśnięciem tętnic szyjnych u dorosłych myszokoczków, podczas gdy po podaniu oseskom szczurzym antagonisty mGluR5 – MTEP nie zaobserwowano działania neuroprotekcijnego. W obu wypadkach nie obserwowano istotnego wpływu MTEP na temperaturę.

Zarówno wyniki omawianej tu publikacji Makarewicz i wsp. (2006), jak i w późniejszych badaniach Śmiałowskiej i wsp. (2012) wykazano, że EMQMCM miał działanie neuroprotekcyjne w modelach *in vivo* na dorosłych szczurach i myszokoczkach. Ponadto Śmiałowska i wsp. (2012) wykazali neuroprotekcyjne działanie tego antagonisty mGluR1 w modelu *in vitro* po wywołaniu ekscytotoksyczności przy użyciu kwasu kainowego. Inkubacja hodowli neuronów izolowanych z kory i hipokampa myszy z kwasem kainowym wywołała silny efekt neurotoksyczny który był mierzony poziomem uwalniania z komórek dehydrogenazy mleczanowej oraz poziomem apoptoz mierzonym

aktywnością kaspazy-3 w tych hodowlach. Nasilenie neurotoksyczności było zależne od zastosowanej dawki kwasu kainowego. W badaniach mikrodializy mózgu szczura kwas kainowy podawano do hipokampa a neurotoksyczność oceniano jako liczbę komórek przeżywających to zdarzenie w warstwie piramidowej kory mózgowej. Badania wykazały, że neuroprotekcja po podaniu EMQMCM może być wywołana poprzez nasilenie transmisji GABA-ergicznej i zahamowanie transmisji glutaminianergicznej (Śmiałowska i wsp. 2012). O ile rola receptorów metabotropowych w ekscytotoksyczności została dość dobrze wyjaśniona (Nicoletti i wsp. 1999, Pellegrini-Giampietro i wsp. 1999, Bruno i wsp. 2001) o tyle ich rola w neuroprotekcji nadal pozostaje niejasna. Bruno i wsp. (2001) podkreślają, że receptory metabotropowe grupy I nie uczestniczą a raczej modulują neurotransmisję pobudzającą i w ten sposób można wyjaśnić hamowanie przez ich antagonistów uszkodzenia wywołanego pobudzeniem receptora NMDA. Związki będące ligandami mGluR1 nie są pozbawione skutków ubocznych, jednak to ich działanie nie dyskwalifikuje ich jako potencjalnych leków, tak jak to miało miejsce w przypadku MK-801. Jakkolwiek EMQMCM mógłby być rozważany jako prekursor leku w leczeniu skutków asfiksji okołoporodowej, to jednak ze względu na działania wywołujące zaburzenia rozwojowe mózgu noworodków poprzez nasilenie apoptoz rozwojowych, jego potencjał neuroprotektoryjny w klinice neonatologicznej jest nie do wykorzystania (Pohl i wsp. 1999, Ikonomidou i wsp. 2000). Jednak jak wykazały badania Śmiałowskiej i wsp. (2012), efekt neuroprotektoryjny występował nawet przy 3-6 godzinnym opóźnieniu w podaniu tego związku po podaniu kwasu kainowego, co może mieć istotne znaczenie kliniczne, lecz tylko w przypadku pacjentów dorosłych.

W omawianej publikacji analizowane były przyczyny braku efektów neuroprotektoryjnych antagonisty mGluR5 u noworodków szczura poddanych hipoksji/ischemii. Należy podkreślić, że stosowani przez nas antagoniści mGluR grupy I dobrze penetrują barierę krew mózg. Ponadto Pietraszek i wsp. (2005) wykazali że EMQMCM oraz MTEP wykazują działanie przeciwłukowe. Ich wpływ na zachowanie badanych zwierząt nie jest jednak tak wyraźny jak w przypadku zastosowania MK-801. W rozważaniach brane były pod uwagę odmienności globalnego, odwracalnego niedokrwienia mózgu dorosłego myszokoczka w porównaniu z modelem hipoksji-ischemii u osesków szczura, który nie jest czystym typem jednego rodzaju niedokrwienia mózgu. Można stwierdzić, że uszkodzenie będące wynikiem ekspozycji noworodków szczura na hipoksję-ischemię jest typem pośrednim między ischemią globalną a ogniskową (Makarewicz i wsp. 2006). Tymczasem efekt neuroprotektoryjny MTEP był także obserwowany w modelu zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u dorosłych szczurów (Szydłowska i wsp. 2007). Neuroprotektoryjne działanie MTEP obserwowano także *in vitro* w hodowlach organotypowych skrawków hipokampa (Szydłowska i wsp. 2007) i hodowlach pierwotnych neuronów korowych (Domin i wsp. 2006) po wywołaniu ekscytotoksyczności kwasem kainowym. W tych badaniach o neuroprotekcji wnioskowano na podstawie działania antyapoptotycznego oraz obniżenia uwalniania z komórek dehydrogenazy mleczanowej. Bao i wsp. (2001) wykazali, że zarówno antagoniści jak i agoniści mGluR5 mają działanie neuroprotektoryjne w ogniskowym uszkodzeniu mózgu, czego nie odzwierciedliły nasze dane uzyskane w modelu asfiksji okołoporodowej. Ponieważ MTEP miał działanie neuroprotektoryjne u zwierząt dorosłych, a nie u noworodków szczura, za najbardziej prawdopodobne wytłumaczenie uznano różnice rozwojowe. Jednak w świetle istniejących badań rozwojowych świadczących o tym, że w mózgu noworodków szczura dominują receptory mGluR5 trudno było jednoznacznie wyjaśnić uzyskane wyniki. Zakładaliśmy, że być może efekt ten jest związany z różnicami w ekspresji w różnych rejonach mózgu tych podtypów receptorów (van del Pol i wsp. 1994, Casabona i wsp. 1997). Z drugiej jednak strony Cambonie i wsp. (2000, 2001) wykazali, że efekt neuroprotektoryjny antagonistów receptorów mGluR grupy I występuje tylko w mózgach niedojrzałych, natomiast w mózgach osobników dorosłych efektu tego nie zaobserwowano. W kontekście tych sprzecznych danych trudno o było o jednoznaczną interpretację naszych wyników dotyczących braku skutecznej neuroprotekcji przez MTEP w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej. Uznano, że te wyniki wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

*Podsumowując, na podstawie tych wstępnych badań można stwierdzić, że antagonistą mGluR5, MTEP nie ma potencjału neuroprotekcijnego w modelu szczurzym asfiksji okołoporodowej. Natomiast wykazujący się efektem neuroprotekcijnym w tym modelu antagonistą mGluR1 - EMQMCM może nie spełniać wymogów bezpieczeństwa we wskazaniu jakim jest zapobieganie skutkom zamartwicy w modelu zwierzęcym. W związku z powyższym zrezygnowano z dalszych badań tego związku.*

- III. Makarewicz D, Słomka M, Danysz W, Łazarewicz JW. Effects of mGluR5 positive and negative allosteric modulators on brain damage evoked by hypoxia-ischemia in neonatal rats. 2015. *Folia Neuropathol.* 53: 301-308.

W ramach kontynuacji współpracy z Merz Pharmaceuticals, kolejnym krokiem w poszukiwaniu skutecznych substancji neuroprotekcyjnych w rozwijającym się mózgu było sprawdzenie działania innych modulatorów receptorów mGlu5, należących do grupy I. Fenobam czyli N-(3-chlorofenilo)-N'-(4,5 dihydro-1-metylo-4-okso-1H-imidazol-2-ylo)mocznik jest selektywnym, negatywnym allosterycznym modulatorem/antagonistą mGluR5 o udokumentowanym działaniu przeciwlękowym i przeciwbólowym (Porter i wsp. 2005, Jacob i wsp. 2009). ADX47273 czyli [S-(4-fluorofenilo)-(3-[3-(4-fluorofenilo)-[1,2,4]oksadiazol-5-ylo]-piperidyna-1-ylo)-metanone] jest pozytywnym modulatorem mGluR5, mogącym potęgować zależne od NMDA funkcje u dorosłych gryzoni. Wykazuje on działanie antypsychotyczne i prokognitywne (Liu i wsp. 2008, Engers i wsp. 2009, Schlumberger i wsp. 2009, 2010, Rosenbreoc i wsp. 2010). Dawki zastosowanych narzędzi farmakologicznych - fenobamu i ADX47273 zostały dobrane na podstawie danych literaturowych (Jacob i in., 2009, Liu et al., 2008). Związki te były testowane pod kątem ich wpływu na uszkodzenie mózgu w modelu asfiksji okołoporodowej. Testowana była hipoteza robocza, oparta na poprzednich wynikach (publikacja II, Makarewicz i wsp. 2006), że u 7-dniowych osesków szczura receptory mGlu5 nie biorą udziału w mechanizmie uszkodzenia mózgu wywołanego przez hipoksję-ischemię.

Uzyskane wyniki wykazały, że żaden z testowanych związków w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej nie miał istotnego działania neuroprotekcijnego, wyrażającego się zmniejszeniem ubytku masy półkuli ischemicznej mózgu, choć fenobam w dawce 10 mg/kg wykazał niezamienną statystycznie tendencję w kierunku działania neuroprotekcijnego, a ADX47273 wykazywał niezależnie od dawki tendencję do zwiększenia ubytku masy mózgu. Zaobserwowano jednak 24 godziny po hipoksji-ischemii znamienne statystycznie obniżenie liczby komórek apoptotycznych w korze mózgowej zwierząt którym podano fenobam w porównaniu do kontroli. Nową interesującą obserwacją jest wykazanie, że fenobam dawce 20 mg/kg nasilał uszkodzenie mózgu w porównaniu z grupą kontrolną. Obydwa testowane związki nie wpływały ani na temperaturę rektalną ani na masę półkuli kontralateralnej. Ta druga obserwacja wskazuje na brak neurotoksycznego działania tych substancji.

Nieoczekiwany neurotoksyczny efekt uzyskany po podaniu fenobamu w dawce 20 mg/kg pozostaje dla nas niejasny; być może wynika on z niespecyficznych oddziaływań metabolitów fenobamu z receptorami mGluR5. Natomiast pozostałe wyniki są niezgodne z przewidywanym wzorem zmian niedokrwiennych mózgu wynikającym z tradycyjnego poglądu, że pozytywne sprzężenie mGluR5 z receptorem NMDA może uczestniczyć w zjawisku uszkodzenia mózgu. Na podstawie danych dotyczących niedokrwiennego uszkodzenia mózgu i funkcjonalnego sprzężenia mGluR5 i receptorów NMDA, można się spodziewać, że negatywna modulacja mGluR5 powinna zapewnić efekt neuroprotekcyny, natomiast zwiększenie aktywności mGluR5 powinno nasilić uszkodzenie w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu. Jednak uzyskane negatywne wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi w pracy II (Makarewicz i wsp. 2006), gdzie antagonistą mGluR5 – MTEP także nie wykazywał neuroprotekcijnego działania w tym modelu, podczas gdy Szydłowska i wsp. (2007) wykazali, że w modelu niedokrwienia mózgu u dorosłych szczurów związek ten dawał efekt neuroprotekcyny. Te wyniki są natomiast zgodne z testowaną hipotezą o znikomej roli receptorów mGlu5 w uszkodzeniu mózgu osesków szczura poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej.

Od dawna prowadzone badania rozwojowe wykazały, że w mózgach niedojrzałych, dominują receptory mGluR5, podczas gdy mGluR1 pojawiają się w pierwszym tygodniu po urodzeniu w bardzo ograniczonej ilości (Catania i wsp. 1994, Lopez-Bendito 2002). Jednak nowsze wyniki badań funkcjonalnych wykazały, że receptory mGluR1 pośredniczą bardziej niż mGluR5 w transdukcji sygnału wapniowego w mózgu w czasie pierwszych dni po urodzeniu (Taketo i Matsuda 2010). Tak więc, nasze wyniki uzyskane z użyciem modelu HI u 7-dniowych szczurów pokazały w sposób pośredni, że funkcjonalność mGluR5 zależy od stopnia rozwoju mózgu i w przypadku 7-dniowych szczurów może być niewystarczająca.

***Wyniki prezentowanej pracy pokazały, że efekt neuroprotektoryjny negatywnego allosterycznego modulatora fenobamu (10 mg/kg) nie jest znamienny przy ocenie ubytku masy mózgu, choć występuje przy ocenie apoptoz. Nie obserwowano także istotnego wpływu pozytywnego allosterycznego modulatora mGluR5 na hipoksyjne uszkodzenie mózgu u noworodków szczura. Te wyniki pokazują więc, że receptory mGluR5 nie są dobrym celem dla strategii terapeutycznych u osesków szczurzych.***

#### **Podsumowanie części „potencjał terapeutyczny wybranych ligandów receptorów grupy I mGluR w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej”.**

1. Uzyskane wyniki nie wskazują na potencjał neuroprotektoryjny agonistów GI mGluR w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej.
2. Antagoniści mGluR5 nie wykazują istotnego działania neuroprotektoryjnego w tym modelu, a jeden z nich fenobam w wysokiej dawce potęguje uszkodzenie mózgu.
3. Wykazano działanie neuroprotektoryjne antagonisty mGluR1, EMQMCM. Poznanie mechanizmu tego efektu wymaga dalszych badań, nie wydaje się jednak by ta substancja załączyła zastosowanie w terapii asfiksji okołoporodowej.

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że nadzieje pokładane w wykorzystaniu ligandów receptorów metabotropowych jako leków neuroprotektoryjnych okazały się przedwczesne. Istnieje zbyt wiele niewiadomych i sprzecznych danych, których ilość wzrasta wraz z pojawianiem się wyników badań coraz to nowych ligandów aby móc na tym etapie zarekomendować tę grupę związków jako potencjalne leki do wykorzystania w klinice, zwłaszcza w klinice neonatologicznej.

#### **Tolerancja na hipoksję-ischemię indukowana przez antagonistów receptorów NMDA w modelach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo*.**

Opisane powyżej badania skierowane były wyłącznie jedynie na poszukiwanie skutecznych leków neuroprotektoryjnych, które mogłyby być zastosowane w klinice neonatologicznej w krótkim czasie po rozwiązaniu ciąży.

Kolejne przeprowadzone przez nas badania dotyczyły alternatywnej strategii zapobiegania uszkodzeniom mózgu wywołanym przez niedotlenienie okołoporodowe. Współczesna medycyna bazująca na skomplikowanych technikach neuroobrazowania jest w stanie ocenić ryzyko wystąpienia epizodów niedokrwienych zarówno u osób dorosłych jak i noworodków/płodów. Pamiętać jednak należy, że patologie łożyska czy naczyń pępowinowych do których dochodzi już w czasie ciąży także są istotną przyczyną asfiksji okołoporodowej. Opracowanie bezpiecznych metod, także farmakologicznych, indukujących tolerancję ischemiczną stwarzałby nowe możliwości zapobiegania lub w przypadku gdy do udaru jednak dojdzie łagodniejszego jego przebiegu. Także w odniesieniu do kliniki neonatologicznej możliwość zastosowania bezpiecznych metod nie zaburzających naturalnych procesów rozwojowych mózgu płodu, mogłaby przyczynić się do istotnego postępu w zapobieganiu skutkom asfiksji okołoporodowej i do dużych oszczędności publicznych środków które wykorzystywane są na długotrwałą, często trwającą niemal przez całe życie rehabilitację, terapię i specjalistyczną opiekę nad dziećmi po przebytej asfiksji okołoporodowej.

W Polsce umieralność okołoporodowa, głównie z powodu zamartwicy, jest wysoka i wynosi ok. 8 promili. (Szczygielski, 2006). Niewątpliwie problem niedotlenienia okołoporodowego jest znaczący i wymaga rozwiązania. Zarysowują się możliwości stosowania komórek macierzystych w terapii zastępczej dla odtworzenia ubytków neuronów, są to jednak odległe perspektywy. Trwa wprowadzanie do praktyki, jako terapii eksperymentalnej, umiarkowanej hipotermii w leczeniu patologii niedokrwiennej mózgu: po zatrzymaniu akcji serca i w zamartwicy (Zalewska i wsp. 2015., Nowacka-Gotwiec, Dunin-Wąsowicz 2012). Jedną z potencjalnych alternatywnych strategii postępowania w udarze i innych formach patologii niedokrwienno-niedotlenieniowej mózgu jest indukcja tolerancji na epizod niedokrwienno-niedotlenieniowy. Prekondycjonowanie ischemiczne polega na wykorzystaniu plastyczności adaptacyjnej mózgu dla indukcji tolerancji neuronów na różne sytuacje patologiczne prowadzące do neurodegeneracji, poprzez uprzednie poddanie organizmu działaniu nieuszkodzających (subletalnych dla neuronów) stresorów fizycznych jak niedokrwienie, niedotlenienie, hipertermia lub czynników farmakologicznych (Obrenovitch, 2008).

Dane literaturowe wskazują na istnienie różnych typów tolerancji w zależności od czasu w którym wystąpi ona po prekondycjonowaniu. Tolerancja może rozwijać się natychmiastowo oraz z opóźnieniem. Tolerancja natychmiastowa jest zjawiskiem krótkotrwałym, trwającym od kilku minut do kilku godzin. Występuje ona np. w mięśniu sercowym. Innym zjawiskiem jest tolerancja rozwijająca się z opóźnieniem trwającym od 12 godzin do trzech dni. Proces ten jest długotrwały i wymaga biosyntezy nowych białek. Ten rodzaj tolerancji jest hamowany przez cykloheksymid, inhibitor syntezy białka. W mózgu wykazano początkowo wyłącznie istnienie tolerancji opóźnionej (Kitagawa i wsp. 1990, Kirino 2002). Objawy jej można było zaobserwować co najmniej 24 godzin po prekondycjonowaniu a ochronne działanie utrzymywało się przez 7 dni, lecz zanikało w ciągu dwóch tygodni (Kitagawa i wsp. 1990). Z czasem wykazano że także w mózgu można indukować formę natychmiastowej lecz krótkotrwałej tolerancji, (Kirino 2002). Badania na szczurzych modelach wykazały, że okno czasowe dla takiej tolerancji mieści się pomiędzy kilkoma minutami a 6 godzinami (Nakase i wsp. 2000), choć u myszy obserwowano ochronę CA1 nawet po 24 godzinach od ischemii (Stagliano i wsp. 1999). Jak wspomniano powyżej, neuroprotekcja w wypadku tolerancji natychmiastowej jest nietrwała. W modelu niedokrwienia przodomózgowia u myszokoczka prekondycjonowanie przeprowadzone 30 min. przed niedokrwieniem uszkadzającym zmniejszało ubytek neuronów w CA1 hipokampa, co było zauważalne po 3 dniach, ale w 7 dniu po epizodzie ischemicznym nie obserwowano już efektu neuroprotekcijnego (Perez-Pinzon i wsp. 1997). Uważa się, że podobnie jak w mięśniu sercowym, mechanizm natychmiastowej tolerancji jest związany z modyfikacjami postranslacyjnymi istniejących białek, a główną rolę mogą tu odgrywać adenozyzna i jej receptor A1 oraz zależne od ATP kanały potasowe (Dirnagl i wsp. 2003). Opóźniona indukcja tolerancji jest natomiast związana z syntezą nowych białek. Podanie inhibitora - cykloheksymidu znosi indukcję tolerancji w tym modelu (Barone i wsp. 1998, Bordet i wsp. 2000). Dlatego też, aby uzyskać neuroprotekcynny efekt tolerancji, zabieg prekondycjonowania należy przeprowadzić przynajmniej 1 dzień przed ischemią testową (Barone i wsp. 1998). Zjawisko indukcji tolerancji ischemicznej dotyczy nie tylko neuronów, lecz obejmuje również inne komórki m.in. komórki glejowe, różne elementy naczyń krwionośnych np. komórki śródbłonna, pericyty, czy komórki mięśni gładkich. W mechanizmach nabywania tolerancji uczestniczą także organelle komórkowe takie jak mitochondria, aparat Golgiego czy siateczka śródplazmatyczna (Wang i wsp. 2015). Tolerancję na ischemię można indukować także przy pomocy tzw. postkondycjonowania gdy działanie bodźca nieuszkodzającego zastosowane było po epizodzie niedotlenienia lub niedokrwienia. Wyniki badań przeprowadzonych w Pracowni Farmakoneurochemii wykazały skuteczność postkondycjonowania przy pomocy łagodnej hiperbarii tlenowej lub hipoksji w modelu asfiksji okołoporodowej (Gamczyk i wsp. 2013). Jednak w prezentowanych poniżej badaniach testowano efektywność prekondycjonowania farmakologicznego przy zastosowaniu antagonistów receptorów NMDA.

Przesłanką do podjęcia opisanych poniżej badań, były wyniki Trembley i wsp. (2000), którzy wykazali, że krótkotrwała ekspozycja hodowli pierwotnych neuronów korowych na działanie MK-801, do 96 godzin przed podaniem różnych czynników uszkadzających o mechanizmie związanym z ekscytotoksycznością i apoptozą, znacząco obniża uszkodzenie neuronów. Skutek ochronny prekondycjonowania przy użyciu MK-801 lub innych antagonistów receptora NMDA zależał od syntezy nowych białek, a więc odpowiadał typowym cechom prekondycjonowania. Te wyniki zostały poddane wstępnej weryfikacji w naszym laboratorium. Kuszczuk i wsp. (2010) wykazali, że MK-801 oraz memantyna, substancje o uznanym działaniu antagonistycznym na receptory NMDA, a także przypuszczalny antagonist tego receptora 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina (1 MeTIQ), podane nawet 48 godz. przed ekspozycją na glutaminian testowanych pierwotnych hodowli neuronów mózgu wykazywały działanie neuroprotektoryjne. Ten nowatorski kierunek badań nie był jednak kontynuowany przez innych autorów. Niezależnie od wspomnianych powyżej wyników uzyskanych *in vitro*, badania pilotowe przeprowadzone przez mnie *in vivo* w modelu asfiksji okołoporodowej także sugerowały nowy, możliwy mechanizm działania antagonistów receptora NMDA poprzez indukcję tolerancji. Brak było możliwości skonsultowania tych wyników z literaturą, ponieważ dotąd nie badano możliwości indukcji tolerancji na ischemię w mózgu *in vivo* przy użyciu antagonistów receptorów NMDA. Te dane skłoniły do sformułowania i weryfikacji hipotezy, sugerującej nowy mechanizm neuroprotektoryjnego działania antagonistów receptorów NMDA na mózg, poprzez indukcję tolerancji na ischemię. W myśl tej hipotezy antagoniści receptorów NMDA, poza ogólnie akceptowanym działaniem neuroprotektoryjnym poprzez bezpośrednie hamowanie toksyczności pobudzeniowej, oraz znanym wpływem neurotoksycznym i zaburzającym rozwój mózgu, wykazują także nie opisaną dotąd w badaniach *in vivo* zdolność do indukcji tolerancji na ischemię to jest do prekondycjonowania (hartowania) mózgu.

Opisane poniżej badania własne (prace IV i V), oraz interpretacja uzyskanych wyników, skupiły się na kilku pokrewnych zagadnieniach. Należało uzyskać argumenty potwierdzające udział indukowanej tolerancji w neuroprotekcji, różnicować między tolerancją na ischemię uzyskaną przez prekondycjonowanie antagonistami receptorów NMDA a bezpośrednim działaniem neuroprotektoryjnym zalegających antagonistów, dokonać postępu w rozumieniu mechanizmów indukowanej przez antagonistów receptorów NMDA tolerancji na ischemię, a z drugiej strony ocenić ryzyko toksycznego, proapoptotycznego działania antagonistów receptorów NMDA na rozwijający się mózg.

#### **Badania własne.**

**IV. Słomka M, Kuszczuk M, Łazarewicz JW, Makarewicz D. NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. 2014. Acta Neurobiol Exp. 74: 396-404.**

W pierwszym etapie, sprawdziliśmy czy prekondycjonowanie MK-801 i memantyną w hodowlach komórek ziarnistych mózdzku będzie miało działanie neuroprotektoryjne po poddaniu ich deprivacji tlenowo-glukozowej (OGD). Model deprivacji glukozowo-tlenowej jest ekwiwalentem *in vitro* patologii niedokrwiennej. Prekondycjonowanie komórek ziarnistych mózdzku antagonistami receptora NMDA 0,5  $\mu$ M MK-801 lub 5  $\mu$ M memantyną, to jest 30-min ekspozycja hodowli na te substancje zakończona wielokrotnym płukaniem, zostało przeprowadzone 24 lub 48 godz. przed testowaniem OGD. Jako kontrolę pozytywną zastosowano poddanie komórek działaniu zawierającymi antagonistów receptora NMDA w trakcie trwającego 90 min. OGD.

Zaobserwowano, że przeżywalność komórek inkubowanych jak i preinkubowanych (prekondycjonowanych) z memantyną lub MK-801 na 24 godz. przed OGD była porównywalna. Natomiast prekondycjonowanie hodowli 48 godz. przed OGD znamiennie słabiej poprawiało przeżywalność testowanych komórek. Nadal jednak wyniki niniejszego badania pokazały, że preinkubacja komórek ziarnistych mózdzku z antagonistami receptora NMDA zarówno 24 jak i 48

godz. przed OGD działa neuroprotekcynie w tym modelu. Wyniki wykazały również, że w hodowlach testowanych 24 i 48 godz. po prekondycjonowaniu następuje zmniejszenie wywołanego podaniem glutaminianu pobierania  $^{45}\text{Ca}$  przez neurony, oraz częściowe obniżenie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Wyniki te sugerują, że zmniejszenie napływu wapnia do neuronów za pośrednictwem receptorów glutaminianergicznym i w konsekwencji obniżenie sygnału wapniowego, co może być elementem mechanizmu indukcji przez antagonistów receptorów NMDA tolerancji ischemicznej.

Wyniki tej pracy interpretujemy częściowo jako efekt indukcji tolerancji wywołanej przez antagonistów receptora NMDA. Zgodnie z wywodem przedstawionym w części wstępnej (powyżej), alternatywna interpretacja uzyskanych wyników może sugerować, że jest to całkowicie lub w dużej części działanie bezpośrednie, jakie na receptor NMDA wywierają zastosowani antagoniści. Interpretację taką dopuszczamy w przypadku MK-801, lecz nie w przypadku memantyny. Mimo, że hamowanie aktywności receptora NMDA wywołane przez MK-801 uchodzi za nieodwracalne, jednak po pewnym czasie ten antagonistę zostaje wyparty z miejsc wiążących wewnątrz receptora NMDA i podlega metabolizmowi (Lin et al., 2002). W przypadku memantyny, która jest słabszym inhibitorem receptora NMDA, cząsteczka tego inhibitora łatwo ulega oddysocjowaniu i szybciej się rozkłada (Möbius et al., 2004). Ze względu na wielokrotne płukanie komórek po prekondycjonowaniu, retencja tych ligandów, a zwłaszcza memantyny, w stężeniu farmakologicznym jest wysoce nieprawdopodobna. Z kolei na rzecz roli indukowanej tolerancji w neuroprotekcji można przywołać wyniki Tremblay et al. (2000), którzy wykazali uprzednio, że efekt neuroprotekcyny obserwowany 48 godz. po prekondycjonowaniu hodowli komórkowych izolowanych z kory mózgowej za pomocą MK-801 może być zablokowany przez cykloheksymid, który jest inhibitorem biosyntezy białka, i tym samym zjawisko to spełnia kryteria indukowanej tolerancji w wyniku prekondycjonowania (Barone et al., 1998). W związku z powyższym uważamy, że w świetle przytoczonych argumentów, prekondycjonowanie komórek antagonistami NMDA indukuje tolerancję na OGD oraz na ekscytotoksyczność wywołaną przez glutaminian.

Pomimo pewnych niejasności dotyczących indukcji tolerancji na OGD, wywołanej prekondycjonowaniem antagonistami receptora NMDA, przedstawione wyniki rzucają światło na kilka aspektów stosowania tych leków w zapobieganiu uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu. Zbieżność występowania neuroprotekcji i hamowania indukowanego przez glutaminian napływu wapnia wewnątrzkomórkowego w komórkach ziarnistych mózdzku 24 i 48 godz. po prekondycjonowaniu antagonistami receptora NMDA, może sugerować związek przyczynowy między tymi zjawiskami. Inaczej mówiąc, jednym z mechanizmów tolerancji neuronów indukowanej przez prekondycjonowanie antagonistami receptorów NMDA wydaje się osłabienie nadmiernych sygnałów wapniowych. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu scharakteryzowania i opisanie mechanizmu tego zjawiska. Ponadto wyniki tej pracy wskazują, że w przypadku antagonistów receptorów NMDA o wysokim powinowactwie do kanału, jak MK-801, neuroprotekcja w modelach niedokrwienia mózgu po prekondycjonowaniu antagonistami receptorami NMDA ma charakter mieszany, wynika z tolerancji indukowanej farmakologicznie a także po części jest efektem dobrze znanego bezpośredniego hamowania receptorów NMDA przez te substancje zalegające przez 24 lub 48 godz. Kwestia różnicowania tych efektów powinna być brana pod uwagę w dalszych badaniach.

***Opisane powyżej wyniki pokazują, że krótkotrwała ekspozycja hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku na antagonistów receptora NMDA 24 lub 48 godz. przed OGD (modelową "ischemią" in vitro) indukuje neuroprotekcję, mierzoną zarówno zwiększoną przeżywalnością testowanych komórek ziarnistych mózdzku jak również obniżeniem indukowanego przez glutaminian sygnału wapniowego, będącego wskaźnikiem ekscytotoksyczności. Zgodnie z naszą interpretacją, te efekty, poza bezpośrednim działaniem hamującym receptory NMDA przez zalegający MK-801, można przypisać prekondycjonowaniu i indukowanej tolerancji ischemicznej.***

**Postulujemy w tej publikacji związek przyczynowo – skutkowy między zahamowaniem napływu wapnia do neuronów a tolerancją na OGD indukowaną przez antagonistów NMDAR.**

- V. Makarewicz D, Sulejczak D, Duszczyk M, Małek M, Słomka M, Lazarewicz J. Delayed preconditioning with NMDA receptor antagonists in a rat model of perinatal asphyxia. 2014. *Folia Neuropathol.* 52: 270-84.

W kolejnym etapie badań weryfikacji *in vivo* poddano testowaną poprzednio wyłącznie na modelach *in vitro* hipotezę o nowym, prekondycjonującym działaniu antagonistów receptora NMDA takich jak MK-801 i memantyna. Podjęto badania mające na celu sprawdzenie, czy podanie zwierzętom antagonistów receptorów NMDA indukuje długotrwałą tolerancję mózgu na ischemię.

Podstawowym modelem doświadczalnym była hipoksja-ischemia indukowana u 7-dniowych osesków szczura, u których po 14 dniach badano ubytek masy półkuli ischemicznej mózgu. Uzyskane wyniki były porównane z ubytkiem liczby neuronów piramidowych w sektorze CA1 hipokampa u dorosłych myszokoczków poddanych odwracalnej globalnej ischemii przodomózgowia. Antagonistów receptorów NMDA, memantynę w dawce 5 mg/kg lub MK-801 w dawce 3 mg/kg podawano dootrzewnowo 24, 48, 72 lub 96 godz. przed epizodem ischemicznym. Ponadto w korze osesków szczura oceniano wpływ prekondycjonowania antagonistami receptorów NMDA na poziom apoptoz konstytutywnych i indukowanych przez hipoksję – ischemię.

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują że u myszokoczków ochronę neuronów piramidalnych hipokampa obserwowano wyłącznie w przypadku podania MK-801, a nie memantyny, i tylko na 24 godz. przed ischemią. Natomiast pojedyncze podanie antagonistów receptora NMDA - memantyny lub MK-801 u niedojrzałych szczurów indukuje długotrwałą neuroprotekcję, wyrażającą się zmniejszeniem wywołanego przez niedotlenienie i niedokrwienie ubytku masy ischemicznej półkuli mózgu. Bardzo silny efekt neuroprotekcji MK-801 utrzymywał się niezmiennie przez co najmniej 96 godz. po podaniu antagonisty, a w przypadku memantyny rozwijał się on z opóźnieniem i trwał od 48 do co najmniej 96 godzin po podaniu, ulegał jednak obniżeniu z czasem. W tych badaniach jako kontrolę pozytywną zastosowano prekondycjonowanie osesków szczura hipoksją normobaryczną. Wyniki naszych badań pokazały, że efekt neuroprotekcji zaobserwowano gdy szczury poddano hipoksji normobarycznej 48, 72 lub 96 godz. przed właściwym eksperymentem, nie zaobserwowaliśmy natomiast neuroprotekcji 24 godz. po prekondycjonowaniu. Podanie ebselenu – zmiatacza wolnych rodników znosiło efekt neuroprotekcji wywołany przez memantynę, ale nie miało wpływu na działanie neuroprotekcji MK-801. Ponadto, podanie zarówno memantyny jak i MK-801 zmniejszyło w równym stopniu, w sposób znamieny statystycznie, do połowy, liczbę apoptoz w mózgu noworodków szczura poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu, ale zwiększało liczbę apoptoz konstytutywnych w mózgu szczurów kontrolnych, przy czym ten niekorzystny efekt memantyny był wielokrotnie słabszy niż MK-801.

#### ***Indukcja tolerancji na ischemię.***

Wyniki naszych badań uzyskanych z użyciem modelu hipoksji-ischemii osesków szczura interpretujemy jako wskazujące na indukowanie przez antagonistę receptora NMDA tolerancji mózgu na ischemię. Jest to pierwsza publikacja demonstrująca takie działanie antagonistów receptorów NMDA. Argumenty popierające to twierdzenie są dwojakie. Po pierwsze, podkreślenia wymaga podobieństwo w dynamice czasowej i efektywności między neuroprotekcją indukowaną przez prekondycjonowanie zwierząt memantyną i efektami prekondycjonowania hipoksją normobaryczną. W obu wypadkach neuroprotekcję obserwowano dopiero 48 godz. po prekondycjonowaniu, a jej efektywność trwała do 96 godz. i zmniejszała się z czasem. Co prawda inni badacze po podaniu zwierząt prekondycjonowaniu ischemicznemu efekt neuroprotekcji obserwowali już 24 godz. po podaniu zwierząt prekondycjonowaniu ischemicznemu (Seo i wsp. 2013., Vannucci i wsp 1998), jednak należy podkreślić, że jednokrotna ekspozycja osesków szczura na stosowaną przez nas

umiarkowaną hipoksję normobaryczną można uznać za słabszy stresor. Drugim ważnym argumentem na rzecz rozwijania się tolerancji na ischemię po podaniu memantyny jest wynik eksperymentu z użyciem zmiatacza wolnych rodników, ebselenu. Ponieważ wykazano, że wolne rodniki pośredniczą w mechanizmie nabywania tolerancji w neuronach (Puisieux i wsp. 2004), hamujące działanie ebselenu, podobnie jak podobieństwo do efektów prekondukcjonowania hipoksją normobaryczną, obserwowane działanie neuroprotektcyjne memantyny wiążemy z indukcją tolerancji na niedokrwienie.

### ***Różnicowanie między indukcją tolerancji a neuroprotektyjnym działaniem zalegających antagonistów receptorów NMDA.***

Rozważając różne warianty interpretacji uzyskanych wyników uwzględniono możliwość długotrwałego wiązania się antagonistów z receptorami NMDA i zalegania ich w mózgu, co sprowadzałoby się do ich bezpośredniego działania neuroprotektyjnego, nie mającego związku z indukowaną tolerancją. Wiadomo, że MK-801 ma silne powinowactwo do miejsca wiązania w kanale receptora NMDA i długotrwanie go blokuje nawet po jego wypłukaniu z przestrzeni pozakomórkowej (Reynolds i wsp. 1998). Okres półtrwania ( $t_{1/2}$ ) MK-801 w mózgu szczurów oceniono na ok. 2 godziny (Vezzani i wsp. 1989). Schwartz i Westerlain (1993) wykazali, że farmakokinetyka MK-801 i jego akumulacja w mózgu siedmiodniowego szczura nie różni się istotnie od farmakokinetyki tej substancji w mózgu szczurów dorosłych (Vezzani i wsp. 1998), co może sugerować, że okres eliminacji z mózgu jest podobny. Jednak badania behawioralne Lysko i wsp. (1992) wykazały długotrwałe zmiany behawioralne nawet po pojedynczym wstrzyknięciu MK-801 do mózgu myszokoczka, sugerując przedłużającą się obecność tego inhibitora w mózgu. Natomiast memantyna wykazuje niskie powinowactwo do receptora NMDA, a blokowanie przez nią kanału NMDA jest krótkotrwałe i zależy od depolaryzacji i aktywacji receptora (Parsons i wsp., 1993). Dlatego jednym z argumentów potwierdzających, że w mózgu osesków szczura zachodzi indukcja tolerancji, a nie zaleganie memantyny, jest uzyskanie w naszej pracy odległych efektów neuroprotektyjnych po podaniu memantyny, a brak takiego efektu po 24 godz., gdy zaleganie tego antagonisty w mózgu byłoby najbardziej prawdopodobne. Nie ulega jednak wątpliwości, że część efektów neuroprotektyjnych MK-801 obserwowanych w tej pracy, można przypisać zaleganiu MK-801 w mózgu. Dotyczy to z pewnością ochronnego działania tego antagonisty obserwowanego wyłącznie po 24 godz. w modelu globalnej ischemii mózgu myszokoczka. Natomiast stale utrzymujący się bardzo silny efekt neuroprotektyjny MK-801 w modelu hipoksji-ischemii mózgu osesków szczura może być wynikiem nałożenia się na siebie obu dyskutowanych mechanizmów.

### **Brak oznak indukcji tolerancji u myszokoczka.**

Badania porównawcze indukcji przez antagonistów receptorów NMDA tolerancji na ischemię u dojrzałych myszokoczków i osesków szczura wykazały brak oznak indukowanej tolerancji w mózgu myszokoczka. Wyniki te mogą sugerować, że jedynie mózgi będące we wczesnej fazie rozwoju mogą być podatne na indukcję tolerancji przy użyciu antagonistów receptora NMDA. Ta konkluzja wymaga jednak dalszych badań.

### **Apoptozy.**

Uzyskane wyniki pokazują, że w warunkach *in vivo* w rozwijającym się mózgu szczura prekondukcjonowanie za pomocą MK-801 indukuje długo utrzymującą się neuroprotekcję, którą w części można przypisać tolerancji na niedotlenienie. Jednak, bez względu na mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska, praktyczne wykorzystanie tej substancji w klinice neonatologicznej jako potencjalnego leku jest niemożliwe ze względu na działania niepożądane takie jak zwiększenie liczby konsydatywnych apoptoz w rozwijającym się mózgu. Uzyskane w omawianej tu pracy wyniki potwierdziły, że obok obniżenia liczby apoptoz wywołanych przez hipoksję - ischemię,

prekondycjonowanie MK-801 znacznie zwiększało liczbę konstytutywnych apoptoz w rozwijającym się mózgu. To ostatnie zjawisko zostało wcześniej wykazane przez Ikonomidou i wsp. (1999) oraz Olney i wsp. (2002). Z drugiej strony, dane z badań *in vitro* i *in vivo* wskazują, że memantyna sama w sobie nie indukuje apoptoz konstytutywnych w modelu pierwotnych hodowli rozwijających się neuronów (Jantas i wsp. 2009) lub w odpowiednich modelach zwierzęcych (Manning i wsp. 2008). Przeprowadzone przez nas badania wykazały niższą niż MK-801 ale wciąż znamienne skuteczną terapeutyczną memantyny stosowanej w dawce 5 mg/kg w modelu hipoksji - ischemii noworodków szczura, wyrażającą się zmniejszeniem ubytku masy półkuli ischemicznej mózgu. Ponadto w tych badaniach po raz pierwszy wykazano, że prekondycjonowanie memantyną indukuje także działanie antyapoptotyczne w mózgu zwierząt poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje *in vitro* Tremblay i wsp. (2000), którzy wykazali że prekondycjonowanie hodowli neuronów korowych za pomocą MK-801 zapobiega apoptozie indukowanej staurosporyną. Należy jednak podkreślić, że badania ujawniły także umiarkowane działanie proapoptotyczne memantyny, to jest pobudzenie apoptoz konstytutywnych, które jednak było około 3,5 do 5-krotnie niższe niż w przypadku MK-801 (3 mg/kg).

### **Perspektywy wykorzystania praktycznego memantyny.**

O ile wyniki uzyskane za pomocą prekondycjonowania MK-801 mają tylko znaczenie poznawcze ze względu na liczne działania niepożądane, to wyniki badań dotyczących wpływu memantyny na indukcję tolerancji ischemicznej mogą mieć potencjalną wartość praktyczną. Memantyna podawana w dawce terapeutycznej wydaje się być równie skuteczna, jak MK-801 w zapobieganiu apoptoz indukowanych przez niedotlenienie okołoporodowe, a jest przy tym kilkakrotnie słabszym induktorem konstytutywnych apoptoz. Wynik ten nie potwierdza obserwacji Manning i wsp. (2011) którzy stwierdzili, że memantyna wydaje się być względnie bezpieczna. Nasze badania wykazały jednak, że stosowanie memantyny u noworodków szczurów może być obciążone pewnym ryzykiem działań proapoptotycznych. Mimo to trzeba pamiętać, że memantyna jest szeroko stosowana u dorosłych do leczenia demencji, zwłaszcza typu alzheimerowskiego (Parsons i wsp. 2013) przy czym wykazanie bezpieczeństwa jej stosowania było cechą warunkującą dopuszczenie tego leku do obrotu (Thomas i Grossberg 2009). Były również prowadzone badania kliniczne, oceniające potencjał terapeutyczny memantyny u dzieci z rozpoznaniem zaburzeń rozwojowych, w tym autyzmu (Chez i wsp. 2007; Owley i wsp. 2006). Memantyna wykazała działanie ochronne w leczeniu leukomalacji okołokomorowej w szczurzym modelu (Manning i wsp. 2008) a także potencjał neuroprotektyny u szczurów poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu (Liu i wsp. 2009). Te dane wskazują na celowość dalszych badań nad indukcją przez memantynę tolerancji na hipoksję/ischemię.

### **Perspektywy praktycznego wykorzystania prekondycjonowania mózgu.**

Proponowanie prekondycjonowania jako strategii terapeutycznej napotyka na problemy koncepcyjne wymagające wyjaśnienia. Nie ulega wątpliwości, że użycie prekondycjonowania z wykorzystaniem subletalnej ischemii lub hipoksji ze względów etycznych nie wejdzie do praktyki w klinice udarów i neonatologii. Jednak takie badania na modelach zwierzęcych mogą mieć istotne znaczenie poznawcze. Pod względem semantycznym termin prekondycjonowanie sugeruje walor profilaktyczny a nie terapeutyczny. O ile w przypadku osób dorosłych zagrożonych udarem profilaktyka ma duże znaczenie, w przypadku zamartwicy pozornie brak jest możliwości technicznych umożliwiających leczenie gdy do niedokrwienia mózgu dochodzi w czasie ciąży np. w przypadku niewydolności łożyska czy naczyń pępowinowych. Jednak trzeba uwzględnić fakt, że współczesna medycyna bazująca na nowoczesnych technikach obrazowania jest w stanie wykryć patologie łożyska czy naczyń pępowinowych i ocenić ryzyko wystąpienia okołoporodowych epizodów niedokrwienych. Nie zawsze jest jednak możliwe zastosowanie najbardziej wskazanego wtedy cesarskiego cięcia. W takich wypadkach opracowanie bezpiecznych metod farmakologicznej indukcji tolerancji ischemicznej stwarzałoby nowe możliwości profilaktyki i łagodzenia skutków zamartwicy. To mogłoby przyczynić

się do dużych oszczędności publicznych środków które wykorzystywane są na długotrwałą, często trwającą niemal przez całe życie rehabilitację, terapię i specjalistyczną opiekę nad osobami po przebytej asfiksji okołoporodowej. Jednym z najnowszych osiągnięć w badaniach nad indukcją tolerancji na ischemię było odkrycie zjawiska postkondycjonowania, w którym subletalny stresor lub czynnik farmakologiczny indukujący tolerancję i neuroprotekcję stosuje się już po ischemii uszkadzającej (Zhao, 2009, Pignataro i wsp., 2009). Jeśli mechanizm tego zjawiska jest zbliżony do mechanizmu prekondycjonowania, wyniki badań dotyczących mechanizmów prekondycjonowania będą mogły w dalszej perspektywie znaleźć zastosowanie terapeutyczne.

Chociaż uzyskane wstępnie dane mogą mieć ograniczone znaczenie praktyczne, istnieją jednak przesłanki, że indukcja tolerancji na niedokrwienie mózgu przez prekondycjonowanie farmakologiczne z użyciem memantyny, antagonisty receptorów NMDA o niskim powinowactwie do kanału, może być skutecznym sposobem ochrony rozwijającego się mózgu przed następstwami niedotlenienia okołoporodowego.

*Badania tej publikacji pokazały, że rozpatrując mechanizmy działania neuroprotekcynowego antagonistów receptorów NMDA konieczne jest różnicowanie między indukcją tolerancji a skutkami zalegania antagonistów w mózgu i ich bezpośredniego zapobiegania nadmiernej aktywacji receptorów NMDA w czasie epizodu niedokrwinnego. Wykazały one po raz pierwszy w eksperymentach in vivo, że prekondycjonowanie przy użyciu memantyny, która jest antagonistą receptorów NMDA, indukuje w mózgu osesków szczura opóźnioną i długotrwałą tolerancję na ischemię, co wyraża się zmniejszeniem ubytku masy półkuli ischemicznej i zmniejszeniem liczby apoptoz. Zbliżone efekty w mózgu osesków szczura wywołuje prekondycjonowanie hipoksyjne. Indukcja tolerancji przez antagonistów receptorów NMDA wydaje się dotyczyć wyłącznie rozwijającego się mózgu szczura. Ponadto badania pokazały, że memantyna ma działanie proapoptotyczne w rozwijającym się mózgu, co komplikuje perspektywy jej zastosowania praktycznego w terapii zamartwicy noworodków.*

#### **Podsumowanie części „Tolerancja na hipoksję-ischemię indukowana przez antagonistów receptorów NMDA w modelach doświadczalnych in vitro i in vivo”.**

1. Uzyskane wyniki wskazują, że prekondycjonowanie komórek ziarnistych mózdzku antagonistami receptora NMDA indukuje tolerancję na OGD.
2. Zaobserwowanej neuroprotekcji towarzyszy obniżenie wywołanego przez glutaminian napływu wapnia do komórek i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, co może sugerować udział hamowania napływu wapnia do neuronów przez kanały NMDA w mechanizmie tolerancji.
3. Po raz pierwszy wykazano na szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej, że antagonist receptorów NMDA memantyna indukuje opóźnioną, długotrwałą i znoszoną przez podanie zmiataacza wolnych rodników tolerancję na hipoksję-ischemię. Efekt ten wydaje się nie mieć związku z zaleganiem tego antagonisty w mózgu. Indukcji tolerancji na ischemię przez antagonistów receptora NMDA nie zaobserwowano jednak w mózgu dorosłego myszokoczka.
4. Wyniki uzyskane przy badaniu efektów memantyny, mimo że zachęcające, nakazują ostrożność, gdyż memantyna choć hamuje apoptozy wywołane przez hipoksję-ischemię, stymuluje jednak apoptozy konstytutywne w mózgu osesków szczurzych.

Efekty praktyczne opisanych powyżej badań, choć odleglejsze ze względu na ich charakter przedkliniczny, są także dostrzegalne. Powszechnie wiadomo, że MK-801 jest wyłącznie substancją farmakologiczną o charakterze referencyjnym, bez perspektyw zastosowania w medycynie, ze względu na wiele działań niepożądanych. Natomiast obiecujące i stosunkowo bliskie zastosowania praktycznego mogłyby się okazać wyniki dotyczące działania prekondycjonującego memantyny. W

wielu krajach, w tym w Polsce, jest ona zarejestrowana jako lek ze wskazaniami terapii objawowej w demencjach, w tym w chorobie Alzheimera, a także jako lek w chorobie Parkinsona. Są jednak wyniki badań wskazujące na terapeutyczne działanie memantyny w zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu, w tym w mózgu osesków szczurzych (Stieg i wsp. 1999, Chen i wsp. 2003, Culmsee i wsp. 2004, Chen i wsp. 2008). Wykazanie udziału indukcji tolerancji na ischemię w mechanizmie działania memantyny wniosłoby nowe ważne elementy do zagadnienia neuroprotekcji. Jednak przed rozważeniem zastosowania praktycznego memantyny w terapii udarów a zwłaszcza zamartwicy noworodków konieczne jest potwierdzenie i wyjaśnienie przyczyny braku jej działania indukującego tolerancję także w dojrzałym mózgu myszokoczka, co pokazano w przedstawionych wyżej badaniach, oraz wyjaśnienie jej toksyczności w rozwijającym się mózgu. W znacznie odleglejszej perspektywie, w przypadkach gdy zagrożenie asfiksją okołoporodową jest realne już w przebiegu ciąży (przy patologii naczyń pępowinowych czy łożyska) można by było rozważyć celowość indukcji tolerancji farmakologicznej u płodu, pod warunkiem wykazania bezpieczeństwa takiego postępowania.

### **Podsumowanie zbiorcze publikacji wchodzących do osiągnięcia habilitacyjnego i wnioski.**

Niniejszy cykl prac dobrze ilustruje fakt, że droga do wdrożenia nowych strategii terapeutycznych w leczeniu niedotlenienia okołoporodowego u noworodków jest długa i kręta. Przedstawione powyżej, zachęcające efekty neuroprotektoryjne wybranych ligandów receptorów dla glutaminianu w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej należy traktować z dużą ostrożnością. Wymaga to dokładnego wyjaśnienia mechanizmu neuroprotektoryjnego działania w tym modelu doświadczalnym nieselektywnego agonisty GI, II i III mGluR - ABHxD-I, oraz antagonisty mGluR1 - EMQMCM. Konieczne jest też sprawdzenie działania obu tych substancji na rozwój mózgu kilkudniowych szczurów i liczbę w nich komórek apoptotycznych. Także indukowanie przez memantynę tolerancji mózgu osesków szczurzych na hipoksję/ischemię, choć jest nowym, potencjalnie bardzo ważnym efektem mogącym ponownie wzbudzić zainteresowanie stosowaniem antagonistów receptorów NMDA w neuroprotekcji, to zagadnienie wymaga dalszych intensywnych badań. Szczególnie istotne będzie dokładne zbadanie wpływu tej substancji na apoptozę i ocena jej potencjalnego działania toksycznego na rozwijający się mózg. Mimo wielu niejasności i konieczności uzyskania odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów działania badanych przez mnie ligandów, w mojej ocenie przedstawione wyniki badań dostarczyły nowych faktów, które można uznać za rozszerzenie istniejącego stanu wiedzy na temat możliwości opracowania farmakologicznych strategii terapeutycznych w noworodkowym modelu niedotlenienia okołoporodowego a w przyszłości także i w klinice neonatologicznej:

- zaobserwowano neuroprotektoryjne działanie nieselektywnego agonisty GI mGluR, ABHxD-I, działającego także na GII i GIII mGluR, oraz antagonisty mGluR1, EMQMCM w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej, jednak istnieje możliwość neurotoksycznego działania tych substancji na rozwijający się mózg, a dokładny mechanizm działania neuroprotektoryjnego jest niejasny. Dane wskazujące na potencjał neuroprotektoryjny antagonistów mGluR1 w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej są obiecujące i zachęcają do dalszych badań.
- inhibitory mGluR5 - MTEP i fenobam, a także pozytywny allosteryczny modulator mGluR5 ADX47273 nie wykazały żadnego działania neuroprotektoryjnego w modelu asfiksji okołoporodowej. W świetle tych wyników, dalsze badania nad modulatorami mGluR5 pod kątem wykorzystania ich jako substancji neuroprotektoryjnych w zapobieganiu skutkom niedotlenienia okołoporodowego wydają się nieuzasadnione.
- antagoniści receptora NMDA mogą indukować tolerancję na hipoksję-ischemię w modelu asfiksji okołoporodowej.

- istnieją przesłanki świadczące o tym, że uzasadnione są dalsze badania przedkliniczne w kierunku rozszerzenia wskazania stosowania memantyny do leczenia zamartwicy. Odkrycie to mogłoby stać się punktem wyjścia do dalszych badań nad tym zjawiskiem, ponieważ ten antagonist receptorów NMDA o niskim powinowactwie do kanału, indukuje tolerancję mózgu noworodków szczura na modelową asfiksję okołoporodową, obniża spowodowany przez hipoksję/ischemię ubytek masy mózgu i obniża liczbę komórek apoptotycznych, przy wykazanym przez nas, ale stosunkowo słabym działaniu pobudzającym apoptozę konstytutywną. Być może to właśnie memantyna która od lat jest stosowana w klinice, jest najbardziej obiecującym kandydatem do prowadzenia dalszych badań w zapobieganiu skutkom asfiksji okołoporodowej. Jednak rozważanie rozszerzenia wskazań do stosowania memantyny musi być poparte dalszymi badaniami tolerancji i bezpieczeństwa.

## Piśmiennictwo:

1. Adamchik Y, Baskys A. Glutamate-mediated neuroprotection against N-methyl-D-aspartate toxicity: A role for metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience*, 2000. 99; 731–736.
2. Albeni B.C., The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr. Pharm. Des.* 2007. 13; 3185-3194.
3. Allen J.W., Knoblach S.M., Faden A. Activation of group I metabotropic glutamate receptors reduces neuronal apoptosis but increases necrotic cell death in vitro. *Cell Death Differ.* 2000. 7; 470–476.
4. Almlil CR, Levy TJ, Han BH, *et al.* BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Exp Neurol.* 2000. 166; 99-114.
5. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, *et al.* Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic- ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 2008. 64; 653-8.
6. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999. 29; 83-112.
7. Bao W.L., Williams A.J., Faden A.I., Tortella F.C. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2001. 922; 173–179.
8. Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke.* 1998. 29; 1937-1950.
9. Behrman R. E. 1996. *Podręcznik pediatrii.* Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.
10. Bond A., Oneill M.J., Hicks C.A., Monn J.A., Lodge D. Neuroprotective effects of a systemically active Group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in a gerbil model of global ischaemia. *Neuroreport.* 1998. 9; 1191–1193.
11. Bond A., Ragumoorthy N., Monn J.A., Hicks C.A., Ward M.A., Lodge D., Oneill M.J. LY379268, a potent and selective Group II metabotropic glutamate receptor agonist, is neuroprotective in gerbil global, but not focal, cerebral ischaemia. *Neurosci. Lett.* 1999. 273; 191–194.
12. Bonifacio S.L.: A new neurological focus in neonatal intensive care. *Nat. Rev. Neurol.* 2011. 7; 485–494.
13. Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, Martin A, Bastide M, Leys D, Lhermitte M, Dupuis B. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000. 20; 1190-6.
14. Bordi F., Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Prog. Neurobiol.* 1999. 59; 55–79.
15. Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., D’Onofrio, M., Di Iorio, P., De Blasi, A., Melchiorri, D., Flor, P.J., Nicoletti, F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. 21; 1013–1033.

16. Cambonie G, Kamenka JM, Barbanel G. Glutamate inhibition of NMDA-induced hydroxyl radical release: an ontogenic study in rat. *Neuroreport*. 2001. 12; 2035–9.
17. Cambonie G, Laplanche L, Kamenka JM, Barbanel G. N-Methyl-D-aspartate but not glutamate induces the release of hydroxyl radicals in the neonatal rat: modulation by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*. 2000. 20; 84–90.
18. Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*. 2000. 75; 889-907.
19. Casabona, G., Knopfel, T., Kuhn, R., Gasparini, F., Baumann, P., Sortino, M.A., Copani, A., Nicoletti, F. Expression and coupling to polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci*. 1997. 9; 12–17.
20. Catania MV, Landwehrmeyer GB, Testa CM, Standaert DG, Penney Jr JB, Young AB. Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience* 1994. 61; 481–95.
21. Chen H, Liu Z, Zhou Z, Jiang M, Qian L, Wu S. The regulatory effect of memantine on expression and synthesis of heat shock protein 70 gene in neonatal rat models with cerebral hypoxic ischemia. *Chin Med J (Engl)*. 2003. 116; 558-564.
22. Chen H, Spagnoli F, Burris M, *et al*. Nanoerythropoietin is 10-times more effective than regular erythropoietin in neuroprotection in a neonatal rat model of hypoxia and ischemia. *Stroke*. 2012. 43; 884-7.
23. Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xu L, Duan WH, Xiong ZQ., Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke*. 2008. 39; 3042-3048.
24. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx*. 2004. 1; 36-45.
25. Chez MG, Burton Q, Dowling T, Chang M, Khanna P, Kramer C. Memantine as adjunctive therapy in children diagnosed with autistic spectrum disorders: an observation of initial clinical response and maintenance tolerability. *J Child Neurol*. 2007. 22; 574-579.
26. Conn P.J., Pin J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1997. 37; 205–237..
27. Culmsee C, Junker V, Kremers W, Thal S, Plesnila N, Kriegelstein J. Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke*. 2004. 35; 1197-1202.
28. Dąmbaska M. 1990, Uszkodzenia przed i okołoporodowe układu nerwowego. W *Neuropatologia kliniczna*. red. J. Dymecki i J. Kulczycki. Instytut Psychiatrii i Neurologii. Warszawa pp. 49-51.
29. Danysz W, Parsons CG. GlycineB recognition site of NMDA receptors and its antagonists. *Amino Acids*. 1998. 14; 205-6.
30. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003. 18; S23-32.
31. Dell' Anna M., Calzolari S., Molinari M., Iuvone L., Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficit and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res*. 1991. 45; 1 25-1 34.

32. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003. 26; 248-254.
33. Domin H, Kajta M, Smiałowska M. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Pharmacol Rep.* 2006. 58; 846-58.
34. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008. 55; 310-8.
35. Engers DW, Rodriguez AL, Williams R, Hammond AS, Venable D, Oluwatola O, Sulikowski GA, Conn PJ, Lindsley CW. Synthesis, SAR and unanticipated pharmacological profiles of analogues of the mGluR5 ago-potentiator ADX-47273. *ChemMedChem.* 2009. 4; 505-511.
36. Engers DW, Rodriguez AL, Williams R, Hammond AS, Venable D, Oluwatola O, Sulikowski GA, Conn PJ, Lindsley CW. Synthesis, SAR and unanticipated pharmacological profiles of analogues of the mGluR5 ago-potentiator ADX-47273. *ChemMedChem.* 2009. 4; 505-511.
37. Gamdzyk M, Makarewicz D, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. Hypobaric Hypoxia Postconditioning Reduces Brain Damage and Improves Antioxidative Defense in the Model of Birth Asphyxia in 7-Day-Old Rats. *Neurochem Res.* 2014. 39:68-75.
38. Gilland E, Hagberg H. 1997. Is MK-801 neuroprotection mediated by systemic hypothermia in the immature rat? *Neuroreport* 8: 1603-1605.
39. Gilland E & Hagberg H. 1996. NMDA-receptor dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1005-1013.
40. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl.* 1997. 422; 85-8.
41. Hellström-Westas L, Rosén I, Svenningsen NW. Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1995. 72; F34-8.
42. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology.* 2008. 55; 289-309.
43. Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev.* 2009. 31; 488-492.
44. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff- Mueser, U., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem. Pharmacol.* 2000. 62; 401-405.
45. Iversen L., Mulvihill E., Haldeman B., Diemer N.H., Kaiser F., Sheardown M., Kristensen P.: Changes in metabotropic glutamate receptor mRNA levels following global ischemia: increase of a putative presynaptic subtype (mGluR4) in highly vulnerable rat brain areas. *J. Neurochem.* 1994. 63; 625-633.
46. Jacob W, Gravius A, Pietraszek M, Nagel J, Belozertseva I, Shekunova E, Malyskin A, Greco S, Barberi C, Danysz W. The anxiolytic and analgesic properties of fenobam, a potent mGlu5 receptor antagonist, in relation to the impairment of learning. *Neuropharmacology.* 2009. 57; 97-108.
47. Jantas D, Lasoń W. Anti-apoptotic effect of memantine against staurosporine- and low-potassium-induced cell death in cerebellar granule cells: a development-dependent effect. *Pharmacol Rep.* 2009. 61; 827-937.
48. Johnston M.V., Faterni A., Wilson M.A., et al.: Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 2011. 10; 372-382.

49. Katsuragi S, Ikeda T, Date I, *et al.* Implantation of encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting cells prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic- ischemic brain insult in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 2005. 192; 1028-37.
50. Keyvani K., Bosse F., Reinecke S., Paulus W., Witte O.W.: Postlesional transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptors: implications for plasticity and excitotoxicity. *Acta Neuropathol.* 2001. 101; 79–84.
51. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002. 22; 1283- 1296.
52. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, *et al.* 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990. 528; 21-24.
53. Kozikowski AP, Steensma D, Araldi GL, *et al.* Synthesis and biology of the conformationally restricted ACPD analogue, 2- aminobicyclo[2.1.1]hexane-2,5-dicarboxylic acid-I, a potent mGluR agonist. *J Med Chem.* 1998. 41; 1641–50.
54. Kuszczak M., Słomka M., Antkiewicz-Michaluk L., Salinska E., Lazarewicz J.W. Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and established uncompetitive NMDA receptor antagonists induce tolerance to excitotoxicity. *Pharmacol. Rep.* 2010. 62; 1041-50.
55. Levine S. Anoxic- ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 1960. 36; 1-17
56. Lin CH, Chen PS, Gean PW. Glutamate preconditioning prevents neuronal death induced by combined oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2008. 589; 85-93.
57. Liu F, Grauer S, Kelley C, Navarra R, Graf R, Zhang G, Atkinson PJ, Popielek M, Wantuch C, Khawaja X, Smith D, Olsen M, Kouranova E, Lai M, Pruthi F, Pulicchio C, Day M, Gilbert A, Pausch MH, Brandon NJ, Beyer CE, Comery TA, Logue S, Rosenzweig-Lipson S, Marquis KL. ADX47273 [S-(4-fluoro-phenyl)-{3-[3-(4-fluoro-phenyl)-[1,2,4]-oxadiazol-5-yl]-piperidin-1-yl}-methanone]: a novel metabotropic glutamate receptor 5-selective positive allosteric modulator with preclinical antipsychotic-like and precognitive activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008. 327; 827-839.
58. Loidl C. F., De Vente J., van Ittersum M. M., van Dijk E. H. J., Vles J. S.H, Steinbusch H. W. M., Blanco C. E. 1998. Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum *Brain Res.* 791: 303-307.
59. Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Fairen A, Lujan R. Dif- ferential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex.* 2002. 12; 625–38.
60. Łosiowski Z. Uszkodzenia układu nerwowego związane z patologią okresu płodowego i okołoporodowego. W *Neurologia dziecięca*. Red. Czocharńska J. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. 1990. Warszawa pp. 326-332.
61. Lyeth B.G., Gong Q.Z., Shields S., Muizelaar J.P., Berman R.F.: Group I metabotropic glutamate antagonist reduces acute neuronal degeneration and behavioral deficits after traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 2001. 169; 191–199.
62. Lysko PG, Gagnon RC, Yue TL, Gu JL, Feuerstein G. Neuroprotective effects of SKF 10,047 in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke* 1992; 23: 414-419.

63. Makarewicz D, Duszczyk M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. 2006. *Neurochem Int.* 48: 485-90
64. Makarewicz D, Gadamski R, Ziembowicz A, Kozikowski AP, Wroblewski JT, Lazarewicz JW. Neuroprotective effects of the agonist of metabotropic glutamate receptors ABHxD-I in two animal models of cerebral ischaemia. 2006. *Resuscitation.* 68: 119-26
65. Makarewicz D, Słomka M, Danysz W, Łazarewicz JW. Effects of mGluR5 positive and negative allosteric modulators on brain damage evoked by hypoxia-ischemia in neonatal rats. 2015. *Folia Neuropathol.* 53: 301-308.
66. Makarewicz D, Sulejczak D, Duszczyk M, Małek M, Słomka M, Lazarewicz J. Delayed preconditioning with NMDA receptor antagonists in a rat model of perinatal asphyxia. 2014. *Folia Neuropathol.* 52: 270-84.
67. Makarewicz D. 2007. <http://lekarskatv.pl/www/audycje.php?id=84>. Dostęp 10.05.2016
68. Manning SM, Boll G, Fitzgerald E, Selip DB, Volpe JJ, Jensen FE. The clinically available NMDA receptor antagonist, memantine, exhibits relative safety in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 2011. 29; 767-773.
69. Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park HK, Park CJ, Volpe JJ, Jensen FE. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci.* 2008. 28; 6670-6678.
70. Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL. Cellular localization of a metabotropic
71. Michałowicz R. Mózgowe porażenie dziecięce. Państwowy Zkaład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa, 1993.
72. Möbius HJ, Stöffler A, Graham SM. Memantine hydrochloride: pharmacological and clinical profile. *Drugs Today (Barc).* 2004. 40; 685-95.
73. Nakase H, Heimann A, Uranishi R, Riepe MW, Kempinski O. Earlyonset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. *Neurosci. Lett.* 2000. 290; 105-108.
74. Nicoletti F., Bruno V., Catania M.V., Battaglia G., Copani A., Barbagallo G., Cena V., Sanchezprieto J., Spano P.F., Pizzi M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology.* 1999. 38; 1477-1484.
75. Nowacka-Gotowiec M., Dunin-Wąsowicz D. Zastosowanie hipotermii leczniczej w encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej noworodków. *Neurologia dziecięca.* 2012. 21; 11-17.
76. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 1984. 307; 462-5.
77. Nyakas C, Buwalda B., Luiten G. M. Hypoxia and brain development. *Prog. Neurobiol.* 49: 1-51 of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.* 1996. 158; 423-34.
78. Obrenovitch TP. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol Rev.* 2008. 88; 211-47.
79. Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 2002. 12; 488-498.

80. Owley T, Salt J, Guter S, Grieve A, Walton L, Ayuyao N, Leventhal BL, Cook EH Jr. A prospective, open-label trial of memantine in the treatment of cognitive, behavioral, and memory dysfunction in pervasive developmental disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2006. 16; 517-524.
81. Palmer C, Brucklacher RM, Christensen MA & Vannucci RC. Carbohydrate and energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*.1990. 10; 227–235.
82. Palucha A, Pilc A. Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR) XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000. pp.53-63.
83. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D., Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*. 1993; 32: 1337-1350.
84. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D., Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*. 1993; 32: 1337-1350.
85. Pellegrini-Giampietro, D.E., Peruginelli, F., Meli, E., Cozzi, A., Albani-Torregrossa, S., Pellicciari, R., Moroni, F. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacology*. 1999. 38; 1607–1619.
86. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997. 17; 175-182.
87. Pietraszek, M., Graviusm, A., Schaferm, D., Weil, T., Trifanova, D., Danysz, W. mGluR5, but not mGluR1, antagonist modifies MK-801-induced locomotor activity and deficit of prepulse inhibition. *Neuropharmacology*. 2005. 49; 73–85.
88. Pignataro G, Scorziello A, Di Renzo G, Annunziato L. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *FEBS J*. 2009. 276; 46-57.
89. Pizzi M., Galli P., Consolandi O., Arrighi V., Memo M., Spano P.F. Metabotropic and ionotropic transducers of glutamate signal inversely control cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration and excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells: pivotal role of protein kinase C. *Mol. Pharmacol*. 1996. 49; 586–594.
90. Pohl, D., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Stadthaus, D., Hubner, C., Olney, J.W., Turski, L., Ikonomidou, C. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. 96; 2508–2513.
91. Porter RH, Jaeschke G, Spooren W, Ballard TM, Büttelmann B, Kolczewski S, Peters JU, Prinssen E, Wichmann J, Vieira E, Mühlemann A, Gatti S, Mutel V, Malherbe P. Fenobam: a clinically validated nonbenzodiazepine anxiolytic is a potent, selective, and noncompetitive mGlu5 receptor antagonist with inverse agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005. 315; 711-721.
92. Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gelé P, Lhermitte M, Lebuffe G, Bordet R. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res*. 2004. 1027; 30-7.
93. Reynolds IJ, Miller RJ. Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol*. 1988. 33; 581–584.

94. Rice J.E., R.C Vannucci, J.B.Brierley. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 1981. 9; 131-141.
95. Rosenbrock H, Kramer G, Hobson S, Koros E, Grundl M, Grauert M, Reymann KG, Schröder UH. Functional interaction of metabotropic glutamate receptor 5 and NMDA-receptor by a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol.* 2010. 639; 40-46.
96. Rothman SM, Samaie M. Physiology of excitatory synaptic transmission in cultures of dissociated rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 1985. 54; 701-13
97. Salińska E., Łazarewicz J.W. Rola wapnia w fizjologii i patologii neuronów. *Postępy biochemii.* 2012. 58; 403-417.
98. Schlumberger C, Pietraszek M, Gravius A, Klein KU, Greco S, Morè L, Danysz W. 2009. Comparison of the mGlu5 receptor positive allosteric modulator ADX47273 and the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 in tests for antipsychotic-like activity. *Eur J Pharmacol.* 2009. 623; 73-83.
99. Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 1999. 38; 1431-76.
100. Schwartz PH, Wasterlain CG. Determination of serum and brain concentrations of neuroprotective and non-neuroprotective doses of MK-801. *J Neurol Sci.* 1993. 115; 26-31.
101. Seo H, Lim KH, Choi JH, Jeong SM. Similar neuroprotective effects of ischemic and hypoxic preconditioning on hypoxia-ischemia in the neonatal rat: A proton MRS study. *Int J Dev Neurosci* 2013. 31; 616-623.
102. Słomka M, Kuszczak M, Łazarewicz JW, Makarewicz D. NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. 2014. *Acta Neurobiol Exp.* 74: 396-404
103. Śmiałowska M, Gołębiewska K, Kajta M, Zięba B, Dziubina A, Domin H. Selective mGluR1 antagonist EMQMCM inhibits the kainate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures and in the rat hippocampus. *Neurotox Res.* 2012. 21; 379-92.
104. Stagliano NE, Perez-Pinzon MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999. 19; 757-761.
105. Stieg PE, Sathi S, Warach S, Le DA, Lipton SA. Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur J Pharmacol.* 1999. 375; 115-120.
106. Szczygielski K. Noworodki – nowa perspektywa demograficzna. 2006. *Nowa Pedatria.* 1; 2-7.
107. Szydłowska K, Kaminska B, Baude A, Parsons CG, Danysz W. Neuroprotective activity of selective mGlu1 and mGlu5 antagonists in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2007. 554; 18-29.
108. Taketo M, Matsuda H. Modulation of intracellular calcium mobilization and GABAergic currents through subtype-specific metabotropic glutamate receptors in neonatal rat hippocampus. *Brain Res Bull.* 2010. 81; 73-80.
109. Thomas SJ, Grossberg GT. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging.* 2009. 4; 367-77.

110. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, Durkin JP. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000. 1; 7183-92.
111. Turski WA, Dziki M, Urbanska E, Calderazzo-Filho LS, Cavalheiro EA. Seizures induced by aminooxyacetic acid in mice: pharmacological characteristics. *Synapse.* 1991. 7; 173-80.
112. Urbańska E, Ikonomidou C, Sieklucka M, Turski WA. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse.* 1991. 9; 129-35.
113. van den Pol, A.N., Kogelman, L., Ghosh, P., Liljelund, P., Blackstone, C. Developmental regulation of the hypothalamic metabotropic glutamate receptor mGluR1. *J. Neurosci.* 1994. 14; 3816–3834.
114. Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates. *J Neurochem* 1998; 71: 1215-1220.
115. Vannucci RC, Yager JY., Vannucci SJ. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994. 14; 279–288.
116. Vezzani A, Serafini R, Stasi MA, Caccia S, Conti I, Tridico RV, Samanin R. Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989. 249; 278-283.
117. Volpe JJ Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis w *Neurology of the newborn.* 1987. Vol. 22 Saunders, Philadelphia. pp. 209-235
118. Wang Y., Reis C., Applegate R., Stier G., Martin R., Zhang J.H. Ischemic conditioning – induced endogenous brain protection: Applications pre-, per-, or post- stroke. *Exp. Neurol.* 2015. 272; 26-40.
119. Yager JY, Brucklacher RM & Vannucci RC. Cerebral oxidative metabolism and redox state during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol.* 1991. 261; H1102–H1108.
120. Younkin D.P. Hypoxic – ischemic brain injury of the newborn – statement of the problem and overview. *Brain. Pathol.* 1992. 2; 209-210.
121. Zalewska T., Jaworska J., Ziemka-Nałęcz M. Current and Experimental Pharmacological Approches in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr Pharm Des.* 2015. 21; 1433-9.
122. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009. 29; 873-885.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych):

Szczegółowe informacje o dorobku naukowym, dydaktycznym, współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi oraz działalności popularyzującej naukę zawarte są w Załączniku 6.

### Praca w IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN.

Po ukończeniu studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, rozpoczęłam pracę w Pracowni Farmakoneurochemi Zakładu Neurochemii IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN na stanowisku asystenta. Od początku działalności początkowo Zespołu a następnie Zakładu Neurochemii, głównym nurtem badań były komórkowe i biochemiczne mechanizmy niedokrwienne uszkodzenia mózgu. Kierunek ten z biegiem lat był wzbogacany i pogłębiany o badania nowych schorzeń i strategii terapeutycznych opartych na neuroprotekcji.

Wkrótce otrzymałam stypendium od Fundacji Naukowej im. Kronenberga na odbycie miesięcznego stażu naukowego. Staż ten odbyłam w Centrum Perinatalnym Uniwersytetu w Goeteborgu, gdzie nauczyłam się metody mikrodializy mózgu a także indukcji niedotlenienia okołoporodowego u noworodków szczura. Techniki te wdrożyłam i rozwinęłam w Pracowni Farmakoneurochemii wykorzystując je także jako model doświadczalny do badań, których zwieńczeniem było uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych, który uzyskałam w 2004 r. Pracując jako doktorantka otrzymałam szereg stypendiów dla młodych naukowców, dzięki którym mogłam zaprezentować swoje wyniki na wielu międzynarodowych konferencjach. Otrzymałam także grant dla młodych naukowców a także grant promotorski, który umożliwił mi sfinansowanie badań będących podstawą mojej rozprawy doktorskiej.

Tematem przewodnim tych badań było zbadanie potencjału neuroprotektynowego dantrolenu i udział receptorów rianodynowych w uszkodzeniu mózgu u szczurów poddanych asfiksji okołoporodowej (Makarewicz i wsp. 2000, Makarewicz i wsp. 2003, Salinska i wsp. 2000). Wykazałam, że dantrolen działa neuroprotektynie w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów poprzez redukcję zmian w mózgu zwierząt po przebyciu epizodu. Uzyskane przeze mnie wyniki badań nie dostarczyły jednak dowodów na neuroprotekcję opartą na hamowaniu receptorów rianodynowych. Badanie wykazały, że w modelu asfiksji okołoporodowej dantrolen hamuje aktywność receptora NMDA co było nowym nieoczekiwanym wynikiem. Mimo obiecujących danych lek ten nie uzyskał rekomendacji do dalszych badań we wskazaniu związanym ze stosowaniem go w zapobieganiu skutkom uszkodzenia mózgu po przebytej asfiksji okołoporodowej, ponieważ nie wiadomo jaki może być jego niekorzystny wpływ na rozwijający się mózg. Mimo, że nie wykazano zaburzeń lokomotorycznych u szczurów w teście otwartego pola nie wiadomo, czy nie powodowałby zaburzeń u dzieci które trudno byłoby wykryć w eksperymentach na zwierzętach. Jednocześnie ryzyko nasilenia konstytutywnych apoptoz rozwojowych jakie wywołują antagoniści receptora NMDA dyskwalifikuje ten lek jako kandydata do leczenia neuroprotektynowego u noworodków. Fundacja "The Henryk and Krystyna Wiśniewski Foundation", przyznała mi nagrodę za dorobek naukowy w dziedzinie neuropatologii/neurobiologii w roku 2004.

Model asfiksji okołoporodowej był atrakcyjnym modelem badawczym dla różnych Pracowni IMDiK PAN, efektem czego były współprace z różnymi grupami badawczymi m.in. z Zakładem Neuropatologii Rozwojowej (Maslinska i wsp. 2002) gdzie wykazano, że wśród cytokin prozapalnych największe znaczenia dla rozwoju procesu zapalnego w mózgu szczura poddanego niedotlenieniu okołoporodowemu może odgrywać interleukina 15 (IL-15), która we wczesnej fazie procesu zapalnego jest produkowana przez leukocyty penetrujące mózg a w późnej fazie także przez reaktywne astrocyty zlokalizowane wokół torbieli i obszarów martwiczych.

Po doktoracie kontynuowałam badania nad mechanizmami neurodegeneracji i neuroprotekcji w modelu asfiksji okołoporodowej. Wówczas rozpoczęłam badania nad udziałem receptorów

metabotropowych grupy I (Makarewicz i wsp. 2006a, b). Wyniki tych badań miałam przyjemność zaprezentować podczas międzynarodowej konferencji „Third Wierzba Conference “Glutamate in CNS metabolism and neurotransmission: interactions at the inter- and intracellular level” która odbyła się w 2005 r. w Wierzbie (ośrodek PAN na Mazurach). Zostałam także zaproszona do wygłoszenia referatu na konferencji dla lekarzy „Nowe perspektywy leczenia udarów mózgu” która odbyła się w Warszawie w 2005 r. Wyniki tych prac weszły w skład przedstawionego w **Załączniku 2** osiągnięcia habilitacyjnego.

W tym czasie aktywnie uczestniczyłam także w projektach naukowych dotyczących m.in. udziału szlaku sygnałowego FAK (ang. *focal adhesion kinase*) w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej (Zalewska i wsp. 2005). Białkowa kinaza FAK (Focal Adhesion Kinase) należy do niereceptorowych kinaz tyrozynowych PTK (protein tyrosine kinase) które w komórce regulują transdukcję sygnału z udziałem integrzyn. Fosforylacja tego białka wpływa na regulację różnych funkcji komórki. Brak regulacji sygnałowej z udziałem kinazy FAK może prowadzić do procesów nowotworzenia oraz pojawienia się procesów patologicznych w obrębie komórek i tkanek. Kinaza białkowa FAK występuje w cytoplazmie w miejscach adhezji komórek do podłoża w tzw. płytkach przylegania i odgrywa istotną rolę w procesach takich jak: adhezja, migracja komórek, proliferacja, różnicowanie się komórek czy apoptoza. Modułacja aktywności kinazy białkowej FAK może wpływać na przekazywanie sygnału w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania w których uczestniczyłam badano udział kinazy białkowej FAK w ewolucji uszkodzenia okołoporodowego. W niniejszym badaniu mierzono ekspresję kinazy białkowej FAK oraz poziom jej fosforylacji i interakcji z białkiem Src oraz białkiem adaptorowym p130 CAS. Wyniki badań wykazały, że poziom fosforylacji tego białka w mózгах poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu obniżył się o ok. 50% między 24 a 48 godz. Po epizodzie niedotlenieniowym. Równocześnie obniżyło się oddziaływanie tego białka z kinazą Src oraz białkiem p130 Cas. Ten objaw wczesnej odpowiedzi na niedotlenienie powrócił niemal do poziomu obserwowanego w mózгах kontrolnych po 7 dniach.

W roku 2006 otrzymałam awans na stanowisko adiunkta w Pracowni Farmakoneurochemii IMDiK PAN. W latach 2006-2008 byłam zaangażowana w różne współprace naukowe m.in. w badanie potencjału neuroprotektynowego CDP-choliny w modelu asfiksji okołoporodowej. Współpraca ta zaowocowała przyznaniem w 2013 r. patentu polskiego nr P-361510 pt. „Sposób ochrony i leczenia tkanek mózgu przed skutkami niedotlenienia i niedokrwienia u ssaka”, którego jestem współautorem (Fiedorowicz i wsp. 2008). CDP-cholina jest substancją o potencjale neuroprotektynowym znanym od ponad 20 lat. Dotychczas nie wykazano jej specyficznego działania ale wykazano, że jest to substancja modulująca różne procesy ochronne w mózgu m.in. wzmacnia działanie systemów antyoksydacyjnych (np. glutationu), hamuje aktywność fosfolipazy A2, stabilizuje strukturę błon komórkowych zmniejszając degradację fosfolipidów, zapobiega neurotoksyczności wywołanej przez glutaminian. W przeprowadzonych badaniach po podaniu CDP-choliny wykazano zmniejszenie aktywności kaspazy-3 a także ekspresji białka HSP-70.

Uczestniczyłam także w badaniach nad udziałem metaloproteaz w uszkodzeniu mózgu u noworodków szczura wywołanym niedotlenieniem (Dragun i wsp. 2008). Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. MMP – matrix metalloproteinases) należą do głównych enzymów proteolitycznych trawiących komponenty macierzy pozakomórkowej oraz liczne molekuly na powierzchni komórek, uczestnicząc przez to w wielu procesach fizjologicznych, takich jak apoptoza czy angiogeneza. Metaloproteiny są również zaangażowane w patogenezę wielu chorób, takich jak np. artretyzm czy nowotwory. Opracowanie skutecznych inhibitorów oraz poznanie mechanizmów ich działania może mieć istotny wpływ na strategie terapeutyczne. W badaniach nad udziałem metaloproteinaz w niedotlenieniu okołoporodowym zbadano aktywność wybranych enzymów MMP-2 i MMP-9. Wyniki wykazały, że aktywność obu badanych białek wzrosła w półkuli ipsilateralnej wzrosła w porównaniu z aktywnością tych białek w mózгах kontrolnych. Najwyższą aktywność tych białek zaobserwowano 48 godz. A także 7-14 dni po niedotlenieniu okołoporodowym. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że zarówno wczesna jak i późna odpowiedź komórkowa na

niedotlenienie może odgrywać rolę w śmierci jak i regeneracji neuronów. Po podaniu nikotynamidu substancji o działaniu przeciwzapalnym, zaobserwowano zahamowanie aktywności MMO-9 w ostrej fazie uszkodzenia niedokrwiennego i aktywację MMP-2 w fazie późnej. Metynikotynamid może więc modulować aktywność enzymów odpowiedzialnych za patologiczny sygnał w macierzy zewnątrzkomórkowej co może stać się celem strategii terapeutycznej wymierzonej w te białka.

Ponadto uczestniczyłam w projektach związanych z badaniem udziału IGF-1 (ang. *insulin – like growth factor*) w niedotlenieniowym uszkodzeniu mózgu u noworodków szczura (Beresevicz i wsp. 2010).

IGF-1 jest peptydem występującym w różnych izoformach i uczestniczącym w regulacji procesów fizjologicznych (IGF-1eA) i w odpowiedzi na różne typy stymulacji (IGF-1Ec). Sugerowana jest także jego rola w neuroprotekcji. W powyższych badaniach ekspresja izoform IGF była badana u zwierząt kontrolnych oraz poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu. U zwierząt kontrolnych zidentyfikowana została ekspresja obydwu badanych izoform IGF-1, podczas gdy w mózgach zwierząt poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu zaobserwowano zwiększoną ekspresję izoformy IGF-1Ec. Wynik ten sugeruje, że izoforma ta może odgrywać istotną rolę w mechanizmach związanych z endogenną ochroną mózgu poddanego niedotlenieniu w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej.

Testowałam także potencjał neuroprotektyny pochodnych witaminy D m.in. kalcitriolu w modelu asfiksji okołoporodowej (Kajta i wsp. 2009). Wyniki badań wykazały, że kalcitriol podawany przewlekłe przez 7 dni w dawce 2 ug/kg a także w jednorazowej iniekcji 30 min. Po hipoksji-ischemii 2 ug/kg skutecznie obniżył stopień uszkodzenia mózgu badanych zwierząt w porównaniu z uszkodzeniem obserwowanym w grupie kontrolnej. Jako referencyjną metodę neuroprotektyną zastosowano prekondycjonowanie hipoksyjne, którego działanie okazało się statystycznie słabsze niż po podaniu kalcitriolu przez 7 dni. Ponadto nie wykazano aby kalcitriol miał negatywny wpływ na przyrost masy ciała badanych zwierząt w trakcie eksperymentu. Wyniki pomiarów tego parametru nie wykazały znamienych statystycznych różnic pomiędzy badanymi grupami.

W 2009 w Pracowni Neurochemii realizowane były badania w ramach projektu finansowanego przez MNiSW „Postkondycjonowanie ischemiczne: zastosowanie łagodnej hipoksji i hiperbarii po uszkadzającym niedokrwieniu mózgu jako nowa strategia terapeutyczna w globalnej ischemii przodomózgowia myszokoczków i hipoksji/ischemii 7-dniowych osesków szczurzych. Celem projektu było sprawdzenie możliwości stosowania postkondycjonowania ischemicznego jako sposobu indukcji tolerancji na ischemię. Po latach rozczarowań związanych z trudnościami nad opracowaniem strategii terapeutycznej chorób takich jak udar niedokrwienno czy niedotlenienie okołoporodowe, oparte na neuroprotekcji, możliwości związane z indukcją tolerancji na ischemię rozbudziły na nowo nadzieje naukowców pracujących nad Mój udział w tym projekcie polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów zastosowania postkondycjonowania hipoksją normobaryczną oraz hipobaryczną u szczurów poddanych niedotlenieniu okołoporodowemu. Wyniki tych prac zostały opublikowane w *Neurochemistry Research* (Gamdzyk i wsp. 2014). W pracy tej szczury poddane niedotlenieniu okołoporodowemu poddane zostały łagodnej hipoksji hipobarycznej pod ciśnieniem 0,47 atmosfery. Jest to ciśnienie jakie panuje na wysokości niskich partiach gór wysokich np. Himalajów (ok. 5000 m. n.p.m.). Hipoksja hipobaryczna była aplikowana w trzech codziennych sesjach. Czas trwania jednej sesji to 1 godz. Kluczowym elementem były czas rozpoczęcia pierwszej sesji hipobarycznej. Zwierzęta podzielone były na 3 grupy różniące się czasem rozpoczęcia hipoksji hipobarycznej. Punkty czasowe rozpoczęcia postkondycjonowania zostały ustalone na 1, 3 i 6 godz. po zakończeniu hipoksji-ischemii. Wyniki wykazały, że postkondycjonowanie rozpoczęte 1 godz. po zakończeniu hipoksji-ischemii najskuteczniej chroniło mózg przed uszkodzeniem mierzonym deficytem masy półkul mózgowych 14 dni po przeprowadzonej hipoksji-ischemii. Rozpoczęcie postkondycjonowania 3 i 6 godz. po zakończeniu hipoksji-ischemii także znamienne zmniejszało stopień uszkodzenia mózgu. Ponadto postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną spowodowało obniżenie poziomu wolnych rodników we wszystkich grupach eksperymentalnych, które było wyższe w porównaniu do grupy SHAM. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej będąca miarą usuwania wolnych rodników tlenowych była

najwyższa w grupie poddanej hipoksji hipobarycznej która rozpoczęła się 1 godz. po zakończeniu hipoksji-ischemii. W pozostałych grupach eksperymentalnych wzrost aktywności tego enzymu nie był istotny statystycznie. Hipoksja hipobaryczna zahamowała także spadek poziomu glutationu wywołanego hipoksją-ischemią oraz zwiększyła aktywność peroksydazy glutationu we wszystkich grupach doświadczalnych. Efekt ten nie miał wpływu na czas rozpoczęcia postkondycjonowania. Przedstawione w pracy wyniki wykazały po raz pierwszy, że u szczurów poddanych hipoksji-ischemii postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną skutecznie zmniejsza uszkodzenie mózgu. Mechanizm tego procesu wymaga dalszych badań ale wstępne wyniki wskazują na udział stresu oksydacyjnego w tym procesie.

W 2009 r. otrzymałam grant z MNiSW który był kontynuacją prac nad możliwościami indukcji tolerancji na ischemię. Publikacje będące efektem tych badań (Makarewicz i wsp. 2014., Makarewicz i wsp. 2015 i Słomka i wsp. 2014) weszły w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego i zostały szczegółowo opisane w autoreferacie (Załącznik 2).

W tym czasie odbyłam także szereg szkoleń organizowanych przez KPK związanych z zarządzaniem projektami finansowanymi z programów ramowych. Przygotowywałam także aplikację w ramach priorytetu potencjał badawczy do 7 Programu Ramowego „...” A także 2 aplikacji w ramach priorytetu Zdrowie (Innovation I i Innovation II) Do tych projektów zdobyłam też dofinansowanie z MNiSW na przygotowanie projektu (tzw. Granty na granty).

W 2011 r. rozpoczęłam studia podyplomowe w Kolegium Zarządzania i Finansów Szkoły Głównej Handlowej w Warszawie „Podyplomowe Studium Zarządzania Projektami” a następnie w 2012 studia podyplomowe w Akademii Leona Koźmińskiego w Warszawie „Zarządzanie projektem badawczym i komercjalizacji wyników badań naukowych”. Studia te pozwoliły mi zdobyć ważne kompetencje menedżerskie oraz nauczyły jak ważne w sukcesie projektu jest dokładne jego zaplanowanie.

#### **Działalność pozainstytutowa.**

Jako osoba ambitna i z dużą predylekcją do wykorzystania wyników badań naukowych w klinice, otrzymałam propozycję od TVN MED przygotowania autorskiego programu edukacyjnego dla lekarzy pt. „Asfiksja okołoporodowa w klinice i laboratorium”. Projekt polegał na przygotowaniu koncepcji programu, napisaniu scenariusza oraz wystąpienia jako gospodarz programu prowadzący rozmowy z naukowcami oraz neonatologiem i przybliżeniu widzom problemów i osiągnięć związanych z leczeniem asfiksji okołoporodowej. W 2007 r. zostałam zaproszona do grupy kreatywnej TVN MED. Opracowującej nowe formaty programów edukacyjnych dla lekarzy. Obecnie programy zrealizowane dla TVN MED są emitowane na platformie internetowej [www.lekarskatv.pl](http://www.lekarskatv.pl)

W 2009 r. rozpoczęłam współpracę z MTZ Clinical Research jako Pisarz medyczny. Moja rola polegała na przygotowywaniu dokumentacji medycznej do badań klinicznych. Były to głównie protokoły do badań produktów generycznych, Karty obserwacji klinicznej, informacje dla pacjenta wraz z formularzami świadomej zgody, broszury badacza oraz raporty z przeprowadzonych badań klinicznych. W latach 2012 -2013 rozpoczęłam pracę w Adamed Sp. z o.o. na stanowisku Specjalisty ds. badań klinicznych. Moje zadania polegały na projektowanie założeń do badań klinicznych w realizowanych przez spółkę. Były to głównie badań biorównoważności i badań tzw. wczesnych faz. Jako reprezentant sponsora koordynowałam także projekty realizacji badań biorównoważności oraz oceniałam dokumentację przygotowywaną przez zakontraktowane ośrodki realizujące badania na zlecenie (CRO) takie jak protokoły, formularze informacji dla pacjenta, karty obserwacji klinicznej, Broszury Badacza, część kliniczna tzw. „simplified IMPD”, raporty końcowe, moduł 5 e-CTD niezbędny do rejestracji produktu leczniczego. Do moich zadań należało także zaplanowanie budżetu do badań klinicznych produktów leczniczych rozwijanych przez grupę Adamed.

W latach 2013-2016 pracowałam w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie początkowo jako Pełnomocnik Dyrektora ds. Administracyjnych, a później jako Zastępca Dyrektora ds. Operacyjnych. W tym czasie poza realizacją zadań związanych ze sprawnym funkcjonowaniem Instytutu byłam członkiem komitetów organizacyjnych 2

międzynarodowych konferencji naukowych (2014: 2016). Moja rola polegała na zapewnieniu obsługi technicznej, logistycznej i administracyjnej konferencji a także na organizowaniu imprez towarzyszących konferencji. W tym czasie zainicjowałam i nadzorowałam także prace nad zarejestrowaniem logotypu Instytutu jako europejskiego znaku towarowego (Świadectwo Rejestracji dla Wspólnotowego Znaków Towarowych nr 014093728.). Podpisałam także umowę ustanawiającą MIBMiK jako Sponsora Strategicznego Biocenu (Centrum Bioedukacji) na mocy której MIBMiK sfinansował inwestycje związane z przeprowadzką Biocenu do nowej siedziby.

W pracy zawodowej najbardziej cenię sobie możliwość realizacji zadań wymagających kreatywności i wykorzystania różnych obszarów wiedzy.

*Łoneta Chaluarewicz*