



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Załącznik 3

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS KARIERY
ZAWODOWEJ ORAZ ISTOTNEJ AKTYWNOŚCI
NAUKOWEJ**

Dr Helena Domin

**Zakład Neurobiologii
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk**

Kraków 2021

SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko.....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt.2 Ustawy.....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	5
4.3. Omówienie ww. osiągnięcia naukowego.....	6
4.3.1. Wprowadzenie.....	6
4.3.2. <i>Metabotropowe receptory glutaminianergiczne grupy III jako potencjalne cele terapii neuroprotekcijnej</i>.....	11
4.3.2.1. <i>Stan wiedzy</i>	11
4.3.2.2. <i>Omówienie wyników – Potencjalne własności neuroprotekcijne ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy III w eksperymentalnej ischemii</i>	15
4.3.2.3. <i>Znaczenie osiągniętych wyników</i>	21
4.3.3. <i>Metabotropowe receptory Y2 i Y5 jako potencjalne cele terapii neuroprotekcijnej</i>...22	
4.3.3.1. <i>Stan wiedzy</i>	22
4.3.3.2. <i>Omówienie wyników – Potencjalne własności neuroprotekcijne ligandów receptorów Y2 i Y5 w eksperymentalnej ischemii</i>	25
4.3.3.3. <i>Znaczenie osiągniętych wyników</i>	27
4.3.4. <i>Metabotropowe receptory Y2 i Y5 jako potencjalne cele terapii przeciwdepresyjnej</i>..28	
4.3.4.1. <i>Stan wiedzy</i>	28
4.3.4.2. <i>Omówienie wyników – Potencjalne własności przeciwdepresyjne ligandów receptorów Y2 i Y5</i>	29
4.3.4.3. <i>Znaczenie osiągniętych wyników</i>	34

4.3.5. Podsumowanie.....	35
4.3.6. Wykaz skrótów.....	36
4.3.7. Piśmiennictwo.....	38
5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.....	45
5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	45
5.2. Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora.....	48
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	54
7. Inne informacje.....	55

1. Imię i nazwisko:

Helena Domin

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

- **15.05.2008** Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, z wyróżnieniem. Praca doktorska pt.: „Neuroprotekcyjne działanie ligandów glutaminianergicznych receptorów metabotropowych oraz ligandów receptorów dla neuropeptydu Y” wykonana w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Promotor: prof. dr hab. Maria Śmiałowska.
- **2003** Zaświadczenie uzyskania kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczycielskiej wydane przez Studium Pedagogiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
- **17.06.2002** Stopień magistra biologii. Praca magisterska pt.: „Wpływ insuliny na aktywność proliferacyjną limfocytów T u zwierząt zdrowych i z insulinozależną cukrzycą” wykonana w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek; biologia. Promotor: dr Stanisław Zaręba.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **01.05.2018** – obecnie adiunkt w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Kraków
- **01.05.2008** – **30.04.2018** asystent w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków
- **01.03.2008** – **30.04.2008** pracownik inżynierjno-techniczny w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków
- **01.10.2007** – **29.02.2008** zleceniobiorca w Zakładzie Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków
- **10.2003** – **09.2007** uczestnik studiów doktoranckich Instytutu Farmakologii PAN, Kraków
- **06.2002** – **08.2002** wolontariusz w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Metabotropowe receptory glutaminianergiczne grupy III oraz receptory Y2 i Y5 jako potencjalne cele terapii neuroprotekcijnej i/lub przeciwdepresyjnej.

4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Osiągnięciem naukowym jest cykl sześciu oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2015-2019 w anglojęzycznych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o sumarycznym współczynniku oddziaływania *impact factor* (IF) równym **23.802** oraz punktacji wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) równej **260** punktów.

Prace przedstawiono w kolejności ich omawiania w punkcie 4.3 autoreferatu.

1. **Domin H***, Jantas D, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of the allosteric agonist of metabotropic glutamate receptor 7 AMN082 on oxygen-glucose deprivation- and kainate-induced neuronal cell death. *Neurochem Int.* **2015**; 88:110-23. Elsevier. (IF₂₀₁₅ = 3.385; punkty MNiSW = 25; liczba cytowań bez autocytaowań: 8).
2. **Domin H***, Przykaza Ł, Jantas D, Kozniwska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I in animal models of ischemic stroke: In vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology.* **2016**; 102:276-94. Elsevier. (IF₂₀₁₆ = 5.012; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań bez autocytaowań: 18).
3. **Domin H***, Przykaza Ł*, Kozniwska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuroprotective effect of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I after ischemic stroke in rats with essential hypertension. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2018**; 84(Pt A):93-101. Elsevier. (IF₂₀₁₈ = 4.315; punkty MNiSW = 35; liczba cytowań bez autocytaowań : 3).
4. **Domin H***, Przykaza Ł[#], Jantas D, Kozniwska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuropeptide Y Y2 and Y5 receptors as promising targets for neuroprotection in primary neurons exposed to oxygen-glucose deprivation and in transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* **2017a**; 344:305-325. Elsevier. (IF₂₀₁₇ = 3.382; punkty MNiSW = 25; liczba cytowań bez autocytaowań: 3).
5. **Domin H**, Szewczyk B, Pochwat B, Woźniak M, Śmiałowska M*. Antidepressant-like activity of the neuropeptide Y Y5 receptor antagonist Lu AA33810: behavioral, molecular, and immunohistochemical evidence. *Psychopharmacology (Berl).* **2017b**; 234(4):631-645. Springer. (IF₂₀₁₇ = 3.222; punkty MNiSW = 35; liczba cytowań bez autocytaowań: 5).

6. **Domin H***, Piergies N, Pięta E, Wyska E, Pochwat B, Właż P, Śmiałowska M, Paluszkiewicz C, Szewczyk B. Characterization of the brain penetrant neuropeptide Y Y2 receptor antagonist SF-11. *ACS Chem Neurosci.* **2019**, 10, 3454-3463. American Chemical Society.
(*IF*₂₀₁₉ = 4.486; punkty MNiSW = 100; liczba cytowań bez autocytaowań: 1).

* - autor korespondencyjny

- Publikacja nr 4 wyniki z eksperymentów *in vivo* dotyczące neuroprotektoryjnych właściwości agonisty receptora Y2 wchodzi do doktoratu P. mgr Łukasza Przykazy, którego jestem promotorem pomocniczym. Natomiast wyniki z eksperymentów *in vitro* dotyczące neuroprotektoryjnych właściwości agonistów receptorów Y2 oraz Y5 wchodzi w skład osiągnięcia naukowego.

Liczba cytowań bez autocytaowań z bazy Web of Science z dn. 12.01.2021 r.

Opis wkładu własnego oraz oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny udział każdego z nich w powstawanie powyższych publikacji zawarte zostały odpowiednio w załącznikach 4 i 6.

4.3. Omówienie ww. osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie

Kwas glutaminowy (Glu) i kwas gamma-amino-masłowy (GABA) są najpowszechniej występującymi neuroprzekaźnikami w mózgu ssaków. Dynamiczna równowaga pomiędzy pobudzającym Glu a hamującym GABA jest podstawą prawidłowej homeostazy czynnościowej mózgu. Zaburzenia fizjologicznej równowagi między GABA a glutaminianem prowadzące do nadaktywności układu glutaminianergicznego może skutkować zmianami patologicznymi, które występują w schorzeniach neurologicznych, między innymi w niedokrwieniu mózgu (Nishizawa, 2001), a także w zaburzeniach psychicznych takich jak depresja, schizofrenia czy lęk (Sanacora i wsp., 2003; Wierońska i Pilc, 2009; Mitchell i Baker, 2010). Sugeruje się, że w tych jednostkach chorobowych dochodzi do nadczynności transmisji Glu oraz hypofunkcji GABA i hamowanie tej nadmiernej transmisji glutaminianergicznej może być jedną ze strategii terapeutycznej w leczeniu tych patologii. Szczególnie obiecujące dla hamowania nadmiernej transmisji glutaminianergicznej wydają się być ligandy receptorów związanych z białkami G (GPCRs, ang. *G-protein coupled receptors*). GPCRs reprezentują największą klasę receptorów błonowych, które modulują aktywność ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i pośredniczą w regulacji tzw. wolnego przekazywania synaptycznego (Greengard, 2001; Conn i wsp., 2009; Komatsu, 2015).

Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat wskazują, że w odróżnieniu od receptorów jonotropowych, właśnie GPSRs są najczęstszym celem strategii terapeutycznych. Około 34% sprzedawanych dzisiaj leków stanowią związki działające na te receptory (Engers i Lindsley, 2013; Azam i wsp., 2020).

Badania naukowe, których wyniki zostały opisane w pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego koncentrowały się wokół roli metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (mGluR) grupy III oraz metabotropowych receptorów dla neuropeptydu Y Y2 i Y5 w schorzeniach OUN takich jak ischemia i depresja. W pracach tych zaprezentowano potencjalne własności neuroprotektcyjne i/lub przeciwdepresyjne ligandów powyżej wymienionych receptorów. Tematyka badawcza wydaje się być niezwykle ważna, ponieważ jak dotąd mimo wielu lat intensywnych badań, żaden związek nie osiągnął skutecznych efektów w leczeniu u ludzi, tak aby mógł zostać zarejestrowany w sposób jednoznaczny do terapii neuroprotektcyjnej w udarze niedokrwiennym mózgu. W przypadku depresji, obecnie stosowane leki przeciwdepresyjne wciąż są mało skuteczne. Dlatego zarówno w ischemii jak i depresji istotne jest poszukiwanie nowych efektywnych strategii terapeutycznych (Chamorro i wsp., 2016; Gururajan i wsp., 2019; Nozohouri i wsp., 2020).

Udar niedokrwienny u ludzi wywołuje zaburzenia poznawcze, ruchowe i czuciowe o różnym nasileniu i często prowadzi do ciężkiej niepełnosprawności a nawet śmierci (Rajach i Ding, 2017). Neuroprotekcja jako szeroko rozumiana ochrona komórek nerwowych przed uszkodzeniem i śmiercią poprzez hamowanie różnego rodzaju szkodliwych czynników, wciąż stanowi nadzieję w leczeniu chorób OUN, w tym udaru mózgu (Karsy i wsp., 2017; Neuhaus i wsp., 2017; Zhou i wsp., 2018). Szczególnie obiecujące dla neuroprotekcji wydają się być ligandy receptorów mGlu, pozbawione niekorzystnych efektów charakterystycznych dla antagonistów jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (iGluR). Receptory mGlu nie biorą bezpośredniego udziału w szybkim przekazywaniu synaptycznym, wywierają jednak istotny wpływ modulujący na neurotransmisję pobudzającą (Conn i Pin, 1997). Ze względu na homologię sekwencji aminokwasowych, profil farmakologiczny oraz typ szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego zostały podzielone na trzy grupy (mGluR I-III). Do grupy I należą podtypy mGluR1 oraz mGluR5, które są receptorami pobudzającymi i poprzez białko $G_{q/11}$ aktywują szlak fosfolipazy C (PLC; ang. *phospholipase C*), natomiast receptory mGlu grupy II (mGluR2 i mGluR3) oraz III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8) są receptorami hamującymi, które poprzez białko $G_{i/o}$ hamują aktywność cyklazy adenylanowej (AC, ang. *adenyl cyclase*) i w konsekwencji prowadzą do obniżenia poziomu

wtórnego przekaźnika cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP) (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) oraz zmniejszenia aktywacji kinazy białkowej A (PKA; ang. *protein kinase A*). Receptory mGluR grupy I zlokalizowane są głównie na błonie postsynaptycznej, gdzie modulują działanie receptorów jonotropowych glutaminianergicznych, natomiast receptory mGlu grupy II i III są zlokalizowane z reguły presynaptycznie w synapsach na zakończeniach glutaminianergicznych jak i GABA-ergicznych, gdzie biorą udział w hamowaniu uwalniania neuroprzekaźników (Pin i Duvoisin, 1995; Conn i Pin, 1997). Receptory mGlu grupy II i III mogą również poprzez białka G_i/G_o aktywować szlak kinaz pro-życiowych takich jak: MAPK/ERK (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase*) oraz PI3-K (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase*) (Ferraguti i wsp., 1999; Iacovelli i wsp., 2002; Ribeiro i wsp., 2017). Jedną z charakterystycznych cech receptorów mGlu jest to, że funkcjonują jako tzw. homodimery, tworzone przez dwie identyczne podjednostki. Każda podjednostka zbudowana jest z dużej domeny zewnątrzkomórkowej, liczącej około 590 aminokwasów, w obrębie której znajduje się miejsce ortosteryczne wiążące glutaminian, określane jako Venus Flytrap domain (VFTD, ang. *orthosteric glutamate binding site*) oraz fragment bogaty w reszty cysteiny (CRD, ang. *cysteine-rich domain*); domeny przezbłonowej (7TMD, ang. *7 trans-membrane domains*) składającej się z siedmiu hydrofobowych α -helis, w obrębie której znajduje się tzw. allosteryczne miejsce wiążące ligand; oraz domeny wewnątrzkomórkowej odpowiedzialnej za zakotwiczenie receptora w błonie komórkowej, a także wiązanie różnych białek odpowiedzialnych za przesyłanie i regulację sygnału wewnątrzkomórkowego. Do aktywacji receptora mGlu występującego jako homodimer, dochodzi w momencie przyłączenia się dwóch cząsteczek glutaminianu (lub innych ortosterycznych ligandów) do obu ortosterycznych miejsc wiążących, co w konsekwencji prowadzi do zmian konformacyjnych receptora i aktywacji odpowiednich białek G. Agoniści allosteryczni, posiadający wewnętrzną aktywność agonistyczną, aktywują receptor bezpośrednio bez obecności liganda ortosterycznego, natomiast pozytywne allosteryczne modulatory (PAMs, ang. *positive allosteric modulators*) lub negatywne allosteryczne modulatory (NAMs, ang. *negative allosteric modulators*) będą odpowiednio zwiększać lub zmniejszać aktywność poszczególnych podtypów mGluRs tylko w obecności liganda ortosterycznego (Niswender i Conn, 2010; Flor i Acher, 2012). Identyfikacja selektywnych ligandów allosterycznych do poszczególnych podtypów receptorów mGlu daje możliwość różnorodnych modulacji

aktywności tych receptorów, zwiększając tym samym zakres potencjalnych efektów terapeutycznych (Hovelsø i wsp., 2012; Gregory i wsp., 2013; Hellyer i wsp., 2017).

Spośród szeregu różnych receptorów zaangażowanych w uwalnianie glutaminianu, na szczególną uwagę, oprócz mGluR, zasługują również metabotropowe receptory dla neuropeptydu Y (NPY). NPY jest 36 aminokwasowym peptydem będący neuroprzebieżnikiem i neuromodulatorem w wielu neuronach OUN (Chronwall i wsp., 1985; Gray i Morley, 1986). W korze mózgowej i strukturach limbicznych występuje przede wszystkim w lokalnych GABA-ergicznych interneuronach (Nakagawa i wsp., 1985), gdzie wykazano jego rolę hamującą na transmisję glutaminianergiczną (Colmers, 1990; Greber i wsp., 1994; Silva i wsp., 2005b). Badania ostatnich kilkunastu lat pokazują, że NPY cieszy się dużym zainteresowaniem wśród badaczy ze względu na jego rolę w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych, a swoje wielokierunkowe działanie biologiczne wywiera poprzez tak zwane receptory Y (YR) (Shende i Desai, 2020). Obecnie wyróżnia się 6 klas receptorów dla NPY, mianowicie Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 oraz Y6, a ich pobudzenie poprzez białko $G_{i\alpha}$ wiąże się z hamowaniem aktywności cykazy adenylanowej, co prowadzi do spadku cAMP i w konsekwencji zmniejszenia aktywności kinazy PKA w komórce (Michel i wsp., 1998). Receptory Y mogą również poprzez białka $G_{q\alpha}$ lub $G_{i\beta/\gamma}$ aktywować ścieżki sygnalizacyjne angażujące kinazy takie jak: kinaza białkowa C (PKC; ang. *protein kinase C*), MAPK/ERK oraz PI3-K (Persaud i Bewick, 2014). NPY jest agonistą wszystkich podtypów YR. Agonistami YR są również endogenne peptydy należące do rodziny peptydu NPY, albo ich zmodyfikowane pochodne, natomiast antagonistami YR mogą być związki wywodzące się ze zmodyfikowanych peptydów Y oraz związki o budowie niepeptydowej (Brothers i Wahlestedt, 2010; Walther i wsp., 2011).

W badaniach do pracy doktorskiej wykazałam neuroprotektoryjne efekty ligandów receptorów mGlu oraz NPY i jego pochodnych w uszkodzeniach ekscytotoksycznych wywołanych kwasem kainowym *in vitro* i *in vivo* (Domin i wsp., 2006; Śmiałowska i wsp., 2009; Domin i wsp., 2010; Śmiałowska i wsp., 2012, Domin i wsp., 2014). Najważniejszym osiągnięciem w tych badaniach było to, że związki działały neuroprotektoryjnie podane w jakiś czas (30 min, 1, 3 lub nawet 6 godz.) po czynniku uszkodzającym. Ma to szczególne znaczenie dla potencjalnych możliwości zastosowania takich związków w klinice, gdzie zwykle możemy wkraczać z neuroprotekcją dopiero w kilka godzin po rozpoczęciu uszkodzenia. Ze względu na potencjalne terapeutyczne zastosowanie badanych substancji oraz nowatorstwo zagadnienia, po uzyskaniu stopnia doktora podjęłam kontynuację badań.

Badania te zostały ukierunkowane na ocenę neuroprotekcyjnych efektów agonistów receptorów mGlu grupy III oraz agonistów receptorów Y2 i Y5 w eksperymentalnej ischemii. W trakcie poszukiwania przeze mnie modyfikowanych analogów NPY działających na receptory Y2 i Y5 jako potencjalnych związków neuroprotekcyjnych, zwróciłam uwagę, że te receptory odgrywają również istotną rolę w depresji. Pomimo wielu lat intensywnych badań patofizjologia depresji jest nadal nieznana, ponieważ nie ma obecnie jednego mechanizmu wyjaśniającego wszystkich aspektów tej złożonej choroby (Czéh i Simon, 2020). Skuteczność obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych jest obserwowana tylko u 70% pacjentów po około 4 tygodniach trwania terapii (Zhang i wsp., 2018). Dlatego też istotnym wydaje się poszukiwanie nowych leków przeciwdepresyjnych o wyższej skuteczności i szybkim czasie działania (Gururajan i wsp., 2019). Badania ostatnich lat wskazują, że NPY odgrywa znaczącą rolę w patogenezie depresji, jak również w odpowiedzi na leczenie lekami przeciwdepresyjnymi. Wykazano potencjalne działanie przeciwdepresyjne ligandów receptorów dla NPY w zwierzęcych modelach depresji, postulując największe znaczenie w występowaniu zaburzeń depresyjnych dla receptorów Y1, Y2 oraz Y5 (Brothers i Wahlestedt, 2010; Morales-Medina i wsp., 2010; Morales-Medina i wsp., 2012a). Jednakże badania z użyciem ligandów receptorów NPY w temacie depresji są nieliczne i fragmentaryczne, a ponadto nie ma badań pokazujących molekularne i komórkowe mechanizmy leżące u podłoża przeciwdepresyjnej aktywności tych substancji. Badania, których wyniki zostały opisane w pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego poszerzyły i pogłębiły wiedzę na temat przeciwdepresyjnej aktywności ligandów YR, w szczególności związków działających na receptory Y2 lub Y5, oraz wyjaśniły jaki jest mechanizm warunkujący szybsze terapeutyczne działanie tych związków.

Badania wchodzące w skład osiągnięcia naukowego skupiły się zatem na następujących zagadnieniach:

- a). **badaniach potencjalnego neuroprotekcyjnego działania ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy III oraz ligandów receptorów Y2 i Y5 w eksperymentalnych modelach ischemii**
- b). **badaniach potencjalnego przeciwdepresyjnego działania ligandów receptorów Y2 i Y5.**

W dalszej części autoreferatu pozycje wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

4.3.2. Metabotropowe receptory glutaminianergiczne grupy III jako potencjalne cele terapii neuroprotektoryjnej

4.3.2.1. Stan wiedzy

Neuroprotekcja to działania mające na celu zapobieganie śmierci neuronów poprzez hamowanie przynajmniej jednego z etapów procesu neurodegeneracji zachodzącej na skutek działania czynnika szkodliwego. Badania ostatnich kilkudziesięciu lat wskazują, iż niezależnie od przyczyny neurodegeneracji ważną rolę w tym procesie odgrywa nadmierne pobudzenie neuronów z uwalnianiem kwasu glutaminowego przy równoczesnych niedoborach energetycznych (ekscytotoksyczność) (Olney, 1978; Puyal i wsp., 2013). Dlatego związki hamujące nadmierną transmisję glutaminianergiczną były najintensywniej badane jako potencjalne neuroprotektory. Próby zapobiegania ekscytotoksyczności stały się możliwe po odkryciu pierwszych receptorów glutaminianergicznych – iGluR (NMDA, AMPA i kainowych), określeniu ich funkcji oraz zsyntetyzowaniu ligandów. Mimo obiecujących wyników badań eksperymentalnych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, zastosowanie antagonistów receptorów iGluR, a zwłaszcza receptora NMDA w leczeniu u ludzi napotkało na poważne ograniczenia, związane głównie z występowaniem licznych efektów niepożądanych, takich jak: psychozy, upośledzenie funkcji poznawczych, pamięci i orientacji oraz zaburzenia ruchowe (Muir i Lees, 1995; Ikonomidou i Turski, 2002; Muir i Lees, 2003; Xu i Pan, 2013; Karsy i wsp., 2017). Obecnie przedmiotem badań eksperymentalnych w temacie neurodegeneracji i neuroprotekcji są między innymi ligandy receptorów mGlu, które ze względu na to, że odpowiadają za modulację pobudzenia, a nie za podstawowe przekazywanie pobudzające wydają się być bezpieczniejsze do terapeutycznego zastosowania niż antagoniści iGluR. W oparciu o wiedzę dotyczącą roli poszczególnych receptorów mGlu w regulacji pobudliwości komórki i przekazywania synaptycznego, poszukiwania skutecznych terapeutycznie ligandów mGluR skupiono na antagonistach receptorów mGlu grupy I oraz agonistach receptorów mGlu grupy II i III. Badania prowadzone zarówno na modelach komórkowych jak i zwierzęcych potwierdziły przewidywania co do potencjału neuroprotektoryjnego związków blokujących receptory mGlu grupy I oraz związków aktywujących receptory mGlu grupy II i III (Nicoletti i wsp., 1996; Bruno i wsp., 2001; Flor i wsp., 2002; Lea i Faden, 2003; Byrnes i wsp., 2009). Jednakże w ostatnich latach pojawiły się wątpliwości co do potencjalnego terapeutycznego zastosowania agonistów receptorów mGlu grupy II w neuroprotekcji. Mianowicie Caraci i wsp. (2011) pokazali, że zastosowanie PAM receptora mGlu2, LY566332, zwiększały toksyczne efekty β -amyloidu zarówno

w hodowlach komórkowych z kory mózgowej szczura jak i w mieszanych hodowlach glejowo-neuronalnych, natomiast efekt ten był odwracany przez zastosowanie antagonisty receptora mGlu2/3, LY341495. Ten nieoczekiwany efekt wzmacniania neurotoksyczności po aktywacji receptora mGlu2 został potwierdzony w badaniu *in vivo* u szczurów w modelu przejściowego globalnego niedokrwienia, w którym selektywny NAM receptora mGlu2, ADX92639, chronił wrażliwe neurony hipokampa obszaru CA1 przed ischemicznym uszkodzeniem, natomiast PAM receptora mGlu2, LY487379, nie tylko nasilał uszkodzenie w CA1, ale także rozszerzał ten proces degeneracji na rejon CA3 hipokampa (Motolese i wsp., 2015). Z kolei jeżeli chodzi o receptor mGlu3 to badania potwierdzają neuroprotektoryjne efekty agonistów tych receptorów, aczkolwiek są doniesienia, że aktywacja mGluR3 może nasilać odpowiedź postsynaptycznego receptora mGlu5 z grupy I, a tym samym zwiększać pobudliwość neuronalną i w konsekwencji ograniczać użyteczność PAM mGluR3 jako skutecznych związków neuroprotektoryjnych (Bruno i wsp., 2017). Receptory mGlu grupy I też budzą wątpliwości jako potencjalne punkty uchwytu dla substancji neuroprotektoryjnych. Wprawdzie większość badań eksperymentalnych potwierdziło neuroprotektoryjne efekty antagonistów tych receptorów w różnych modelach ekscytotoksyczności wywołanej substancjami toksycznymi, ischemii lub uszkodzeń traumatycznych, niemniej jednak postulowany jest szkodliwy wpływ NAMs receptora mGlu5 na funkcje poznawcze, co poważnie ogranicza zastosowanie takich substancji w chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (Bruno i wsp., 2017).

Dlatego w dalszej części autoreferatu chciałam pokazać, na podstawie badań innych autorów, a także moich wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, że **receptory mGlu grupy III są atrakcyjnym potencjalnym celem dla terapii neuroprotektoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w uszkodzeniach ischemicznych**. Pierwsze badania w obszarze neuroprotekcji prowadzono wykorzystując nieselektywne związki ortosteryczne. Badania wykonane zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* pokazały neuroprotektoryjne efekty ortosterycznych nieselektywnych agonistów receptorów mGlu grupy III takich jak: L-AP4, L-SOP i (RS)-PPG, ACPT-I w różnych modelach degeneracji ekscytotoksycznych (Bruno i wsp., 1996, 2000; Gasparini i wsp., 1999; Lafon-Cazal i wsp., 1999; Henrich-Noack i wsp., 2000; Iacovelli i wsp., 2002; Domin i wsp., 2014). W większości badań innych autorów agoniści podawani byli przed, równocześnie lub zaraz po czynniku uszkodzającym. Natomiast nasze eksperymenty w modelach ekscytotoksyczności wywołanej kwasem kainowym *in vitro* w hodowlach z kory mózgowej i hipokampa myszy jak i *in vivo*

u szczurów w hipokampie pokazały, że ACPT-I działa neuroprotekcynie podany po 3 godz. od zainicjowania uszkodzenia (Domin i wsp., 2014).

Bruno i wsp. (2000) zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo* postulują udział receptora mGlu4 w neuroprotekcji. Mianowicie wykazali, że L-AP4 hamował toksyczne efekty NMDA w hodowlach z kory mózgowej myszy, ale nie działał w hodowlach pozbawionych receptora mGlu4, natomiast (RS)-PPG nie wykazywał aktywności neuroprotekcynnej u myszy pozbawionych receptora mGlu4. Ponadto zaobserwowali, że hodowle z kory mózgowej myszy pozbawione receptora mGlu4 były bardziej wrażliwe na ekscytotoksyczne działanie NMDA niż hodowle posiadające ten receptor. Dalsze badania z wykorzystaniem związków selektywnych, w tym allosterycznych potwierdziły zaangażowanie receptora mGlu4 w patomechanizm uszkodzenia neuronów i neuroprotekcji w różnych modelach degeneracji. Pierwszym pozytywnym allosterycznym modulatorem receptora mGlu4 był związek PHCCC, który w modelach *in vitro* powodował zwiększenie powinowactwa glutaminianu do tego receptora (Marino i wsp., 2003). Badania eksperymentalne prowadzone z użyciem PHCCC wykazały jego potencjalną aktywność neuroprotekcynną w uszkodzeniach ekscytotoksycznych (Maj i wsp., 2003), ischemicznych (Moyanova i wsp., 2011), czy też przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych (model choroby Parkinsona) (Battaglia i wsp., 2006), jednakże jego niska rozpuszczalność w wodzie, słaba biodostępność, a także powinowactwo również do receptora mGlu1, potencjalnie ograniczały jego użyteczność jako PAM receptora mGlu4 (Niswender i wsp., 2008). W miarę dostępności bardziej selektywnych PAMs receptora mGlu4 (VU0155041, LuAF21934, VU0364770, VU0400195 oraz ADX88178) pojawiały się kolejne doniesienia potwierdzające zaangażowanie receptora mGlu4 w patomechanizm choroby Parkinsona i wskazujące na duży potencjał ligandów tego receptora jako potencjalnych związków użytecznych w terapii tej choroby (Niswender i wsp., 2008; Jones i wsp., 2011, 2012; Célánire i Campo, 2012; Betts i wsp., 2012; Iderberg i wsp., 2015; Litim i wsp., 2017).

Spośród receptorów mGlu grupy III również receptor mGlu7 ma znaczenie w neuroprotekcji. Pierwszym i jak dotąd jedynym, selektywnym aktywatorem receptora mGlu7 jest AMN082 (N,N'-Bis(diphenylmetylo)-1,2-ethanodiamina), scharakteryzowany jako allosteryczny agonista tego receptora (Mitsukawa i wsp., 2005). Wykazano neuroprotekcynne efekty AMN082 zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo* przeciwko toksycznym i pro-apoptotycznym efektom sewofluranu (Wang i wsp., 2012). W naszych badaniach *in vitro* w hodowlach z kory mózgowej i hipokampa myszy AMN082 zapobiegał

neurotoksycznym i pro-apoptycznym efektem kwasu kainowego, przy czym efekt ten był znoszony przez negatywnego allosterycznego modulatora receptora mGlu7, MMPIP (Domin i wsp., 2015). Neuroprotektoryjne i glioprotektoryjne efekty AMN082 zaobserwowano również w modelach uszkodzeń apoptotycznych (staurosporyna i doksorubicyna) oraz apoptotyczno-nekrotycznych (MPP(+)) (Jantas i wsp., 2014, 2015, 2016, 2018).

Nieliczne dane pokazują, że receptor mGlu8 również może mieć znaczenie w neuroprotekcji. Obecnie dostępne są dwa związki mające powinowactwo do receptora mGlu8, mianowicie ortosteryczny agonista (S)-3,4-DCPG, wiążący się preferencyjnie do tego receptora oraz mGluR8 PAM, AZ12216052. W badaniach *in vivo* u noworodków szczurzych (S)-3,4-DCPG wykazywał działanie przeciwdrgawkowe i neuroprotektoryjne przeciwko neurotoksycznym efektom kwasu homocysteinowego (Folbergrová i wsp., 2008), a także działał neuroprotektoryjnie w badaniach *in vitro* w modelu komórkowym choroby Parkinsona z zastosowaniem neurotoksyny dopaminergicznej MPP(+) (Jantas i wsp., 2014). W badaniach *in vitro* w modelach uszkodzeń apoptotycznych (staurosporyna i doksorubicyna) oraz apoptotyczno-nekrotycznych (MPP(+)) zaobserwowano również neuroprotektoryjne efekty mGluR8 PAM, AZ12216052 (Jantas i wsp., 2014, 2015).

Jak widać na podstawie przytoczonej powyżej literatury niewiele jest badań pokazujących rolę receptorów mGlu grupy III w uszkodzeniach ischemicznych mózgu. Testowany na skrawkach hipokampa szczura w warunkach hipoksji/hipoglikemii (RS)-PPG przywracał amplitudę potencjału polowego tych skrawków, co było oznaką żywotności komórek (Sabelhaus i wsp., 2000), jednakże w modelu ogniskowej ischemii u myszy lub globalnej ischemii u gerbilia oraz szczurów, ten ortosteryczny agonista receptorów mGlu grupy III nie działał neuroprotektoryjnie (Henrich-Noack i wsp., 2000). Moyanova i wsp. (2011) wykazali, że myszy pozbawione receptora mGlu4 były bardziej wrażliwe na uszkodzenia ischemiczne. Ponadto PHCCC działał neuroprotektoryjnie w modelu permanentnej ogniskowej ischemii u myszy podany 30 min przed wywołaniem niedokrwienia oraz w modelu 3-minutowej ogniskowej ischemii wywołanej endoteliną 1 u szczurów podany 20 min po wywołaniu niedokrwienia. Tak jak już napisałam powyżej, pomimo obiecujących badań przedklinicznych, do tej pory nie znaleziono skutecznego i bezpiecznego leku neuroprotektoryjnego w udarze niedokrwinnym mózgu. **Dlatego wysoce zasadne jest poszukiwanie nowych substancji skutecznych w neuroprotekcji przy poprawionej metodologii badań.**

4.3.2.2. Omówienie wyników - Potencjalne własności neuroprotektoryjne ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy III w eksperymentalnej ischemii

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracach: Domin i wsp., 2015; Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2018.

Udar niedokrwienny (ischemia) jest najczęstszą (około 85%) postacią udaru mózgu, a dochodzi do niego na skutek zamknięcia bądź znacznego zwężenia naczynia doprowadzającego krew do jakiegoś obszaru mózgu. Całkowite zatrzymanie lub częściowy spadek przepływu krwi prowadzi m.in. do spadku stężenia tlenu i glukozy, depolaryzacji błon komórkowych, zaburzenia funkcji mitochondriów i homeostazy wapnia (Ca^{2+}), nadmiernego wyrzutu glutaminianu odpowiedzialnego za ekscytotoksyczność, co w konsekwencji doprowadza do rozszerzania się strefy uszkodzenia. W następstwie ekscytotoksyczności i nadmiernego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} dochodzi do aktywacji wielu enzymów (syntazy tlenu azotu, lipaz, proteaz, endonukleaz), wzrostu wolnych rodników tlenowych, które mogą generować kaskadę reakcji prowadzących do zaburzenia struktury i funkcji błon biologicznych zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony neuronów doprowadzając do śmierci komórki na drodze nekrozy lub apoptozy (Durukan i Tatlisumak, 2007; Pedata i wsp., 2016). Przedstawione powyżej procesy w tak zwanej kaskadzie niedokrwiennej przebiegają z określoną dynamiką i natężeniem, które zależą od charakteru niedokrwienia, czasu, jaki upłynął od jego rozpoczęcia, a także od lokalizacji uszkodzonego obszaru. W neuronach mózgu po ischemii stwierdza się w zasadzie continuum nekrotyczno-apoptotyczne, w którym występują z różnym nasileniem zarówno nekroza jak i apoptoza (Martin i wsp., 1998). Ten obszar wtórnego uszkodzenia związany z kaskadą niedokrwienną, tzw. „strefa półcienia” (ang. *penumbra*), wokół mniejszego, pierwotnego uszkodzenia, rozszerza się w ciągu kilku do kilkunastu godzin (Catanese i wsp., 2017) i może stanowić cel działań terapeutycznych.

Hipoteza badawcza tej części prac dotyczyła sprawdzenia, czy wybrane ligandy receptorów mGlu grupy III będą działać neuroprotektoryjnie w modelach eksperymentalnej ischemii *in vitro* i *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem podawania związków w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia niedokrwienia. Po drugie chcieliśmy sprawdzić, które receptory mGlu grupy III zaangażowane są w neuroprotekcję w ischemii, a także zbadać potencjalny mechanizm neuroprotektoryjnego działania badanych związków. Ponieważ w leczeniu pacjentów po udarze najistotniejszym

efektem końcowym jest stan neurologiczny i funkcjonalny chorych, dlatego w modelu *in vivo* ocena wyników badań prowadzona była na podstawie nie tylko zmniejszenia zakresu uszkodzenia, ale również stanu funkcjonalnego zwierząt. Ponadto, aby przybliżyć nasze badania do sytuacji klinicznej, gdzie chorzy z udarem niedokrwiennym często obciążeni są chorobami współistniejącymi takimi jak na przykład nadciśnienie tętnicze, eksperymenty przeprowadziliśmy nie tylko na szczurach zdrowych szczepu Sprague-Dawley, ale także na szczurach z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR, ang. *spontaneously hypertensive rat*).

Model eksperymentalnej ischemii *in vitro* przeprowadzany był w pierwotnych 8 dniowych hodowlach neuronalnych z kory mózgowej embrionów mysich poddanych deprivacji tlenu i glukozy (model OGD, ang. *oxygen and glucose deprivation*), który jest uznanym i powszechnie stosowanym modelem komórkowym udaru niedokrwiennego (Goldberg i Choi, 1993). Biochemiczny pomiar uwalniania do medium dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz biochemiczna ocena przeżywalności komórek w hodowli za pomocą testu redukcji MTT wykazała, iż istotne statystycznie degeneracje (50% spadek przeżywalności) występują po 3 godz. pozbawienia komórek tlenu i glukozy (Domin i wsp., 2015) i na tak ustawionym modelu OGD weryfikowaliśmy efektywność neuroprotekcijną ligandów receptorów mGlu grupy III. Niewątpliwą zaletą zastosowania modelu *in vitro* była możliwość przetestowania dużej ilości związków w stosunkowo krótkim czasie. Tak więc do eksperymentów użyliśmy następujących ligandów: **ACPT-I** – agonista **ortosteryczny mGluR III**; **PHCCC, VU0155041** – **mGluR4 PAMs**; **AMN082** – agonista **allosteryczny mGluR7**; **(S)-3,4-DCPG** – agonista **ortosteryczny mGluR8**; **MMPIP** – **negatywny allosteryczny modulator mGluR7**; **CPPG** – antagonistę **ortosteryczny mGluR III**. Za pomocą testów LDH i MTT wykazaliśmy, że zarówno ACPT-I jak i AMN082 zmniejszały śmiertelność i zwiększały przeżywalność neuronów w hodowli podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD, a także jednorazowo tuż po lub 30 min po zakończeniu ischemii (Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2015). Efekty neuroprotekcyjne wywołane przez allosterycznego agonistę mGluR7, AMN082, były znoszone przez NAM mGluR7, MMPIP, sugerując, że efekty te były zależne od receptora mGlu7 (Domin i wsp., 2015). W przypadku ACPT-I efekty neuroprotekcyjne były odwracane przez zastosowanie antagonisty receptorów mGlu grupy III, CPPG (Domin i wsp., 2016). Ponieważ ACPT-I w stężeniach mikromolarnych aktywuje receptory mGlu4, mGlu6 oraz mGlu8, natomiast w minimolarnych również receptory mGlu7 (Flor i Acher, 2012), postanowiliśmy sprawdzić,

który z tych receptorów odpowiedzialny był za neuroprotektoryjne efekty ortosterycznego agonisty. Występowanie receptorów mGlu6 ogranicza się tylko do komórek siatkówki (Nakajima i wsp., 1993), zatem receptory mGlu4, mGlu7 i/lub mGlu8 mogły być zaangażowane w obserwowane efekty ACPT-I. Ponieważ ortosteryczny agonista działał neuroprotektoryjnie w zakresie stężeń mikromolarnych (10-200 μ M) i jak pokazano w Tabeli nr 1 efekt ochronny był silniejszy dla ACPT-I w porównaniu z efektami wywieranymi przez AMN082, dlatego też rolę receptora mGlu7 również należałoby wykluczyć.

	ACPT-I (10-200 μ M)		AMN082 (0.1-1 μ M)	
	LDH	MTT	LDH	MTT
tuż przed + tuż po OGD	25-56%	21-35%	33-42%	19-26%
tuż po OGD	26-41%	16-32%	30-38%	18-26%
30 min po OGD	32-40%	24-26%	34-38%	22-25%

Tabela 1. Efekty agonistów receptorów mGlu grupy III na uwalnianie LDH oraz przeżywalność komórek w hodowlach pierwotnych z kory mózgowej poddanych OGD (3 godz.) mierzone testami LDH oraz redukcji MTT i wyrażone jako % zmian kontroli.

W celu sprawdzenia czy za neuroprotektoryjne efekty ACPT-I w modelu ischemii *in vitro* odpowiedzialne są receptory mGlu4 i/lub mGlu8 sprawdziliśmy potencjalne efekty ochronne PAMs receptora mGlu4, PHCCC oraz VU 0155041 oraz agonisty ortosterycznego receptora mGlu8, (S)-3,4-DCPG. Zaobserwowaliśmy neuroprotektoryjne działanie obu PAMs receptora mGlu4, natomiast efektu neuroprotektoryjnego nie wykazywał agonista receptora mGlu8. Zaobserwowaliśmy również synergizm w neuroprotektoryjnym działaniu niskich nieefektywnych stężeń ACPT-I oraz PAMs, co potwierdziło zależność uzyskanego efektu neuroprotektoryjnego od aktywacji receptora mGlu4 w neurotoksyczności wywołanej ischemią.

Zgodnie z zasadą zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (3R), aby ograniczyć liczbę zwierząt użytych do doświadczeń tylko w modelu *in vitro* sprawdziliśmy wybrane mechanizmy działania badanych związków. Spośród licznych szlaków sygnalizacji komórkowej, które mogą być zaangażowane w śmierć komórkową indukowaną przez OGD wykazano aktywację wapniowo-zależnych proteaz cysteinowych – kalpain oraz kaspaz (Newcomb-Fernandez i wsp., 2001; Malagelada i wsp., 2005). Aktywacja kaspaz jest specyficzna dla apoptozy, natomiast aktywacja kalpain świadczy, że śmierć komórkowa zachodzi zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy (Chaitanya i Babu, 2008). Stosując metodę Western blot wykazaliśmy wzrost aktywności kalpain mierzonej wzrostem ilości produktu rozpadu alfa-spektryny II (145 kDa), 3 godz. oraz 6 godz. po zakończeniu OGD. Takiego wzrostu nie zaobserwowaliśmy tuż po zakończeniu OGD (**Domin i wsp., 2015**).

Natomiast nie zaobserwowaliśmy wzrostu produktu rozpadu alfa-spektryny II do fragmentów o masie 120 kDa, co świadczyłoby o wzroście aktywacji kaspaz, zatem w stosowanym przez nas modelu OGD degeneracje w hodowlach zachodziły głównie poprzez procesy nekrozy. Na potwierdzenie powiązania aktywacji kalpain w naszym modelu OGD zaobserwowano efekty neuroprotektcyjne inhibitora kalpain MDL28170 w testach LDH oraz MTT (**Domin i wsp., 2015**). Ponadto wykazaliśmy, że zarówno ortosteryczny agonista receptorów mGlu grupy III, ACPT-I, jak i allosteryczny agonista receptora mGlu7, AMN082 podawane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD w sposób istotny statystycznie obniżały aktywację kalpain (**Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2015**). W naszym modelu ischemii *in vitro*, oprócz aktywacji kalpain zaobserwowaliśmy znaczący wzrost komórek zabarwionych jodkiem propidyny (PI), co potwierdziło większą rolę nekrozy niż apoptozy w naszych hodowlach poddanych OGD. Analiza mikroskopowa komórek zabarwionych PI wykazała, że zarówno ACPT-I jak i AMN082 zmniejszały w sposób znamieny zmiany nekrotyczne w hodowlach (**Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2015**).

Tak jak to już zostało napisane powyżej patologicznym procesem zaobserwowanym w ischemii jest nadmierny wyrzut glutaminianu prowadzący do ekscytotoksyczności. W naszym modelu ischemii *in vitro* poprzez oznaczanie fluorometryczne metodą enzymatyczną przy użyciu zestawu odczynników *Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase* zaobserwowaliśmy nadmierne uwalnianie glutaminianu 24h po zakończeniu OGD (**Domin i wsp., 2016**). Na potwierdzenie powiązania nadmiernej transmisji glutaminianergicznej w naszym modelu OGD wykazaliśmy efekty neuroprotektcyjne antagonisty receptora NMDA, MK-801 w testach LDH oraz MTT (**Domin i wsp., 2016**). W następnej kolejności zaobserwowaliśmy, że zarówno ACPT-I jak i MK-801 podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD, a także jednorazowo tuż po zakończeniu ischemii zmniejszały w sposób istotny statystycznie uwalnianie glutaminianu indukowane OGD, a efekt ten korelował ze stopniem neuroprotekcji wywieranej przez te związki (**Domin i wsp., 2016**).

Badając mechanizmy neuroprotektynnego działania ACPT-I zwróciliśmy uwagę, na szlak wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału cAMP/PKA, który jest bezpośrednio związany z aktywacją receptorów mGlu grupy III, a którego zaangażowanie w śmierć komórkową indukowaną przez OGD wykazano w pracy Zhu i wsp. (2018). Zaobserwowaliśmy, że aktywator cAMP zależny od PKA, 8-Bromo-cAMP znosi neuroprotektcyjne efekty ACPT-I, a inhibitor PKA, H89 działa neuroprotektynnie podany

dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD, w stopniu porównywalnym do działania ACPT-I co wykazano w testach LDH jak i MTT (**Domin i wsp., 2016**). Inny wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania sygnału, który jest związany z aktywacją receptorów mGlu grupy III i którego pro-życiową rolę wykazano w uszkodzeniach ischemicznych to szlak sygnałowy PI3-K/Akt. W naszym modelu OGD inhibitor PI3-K, LY294002 nie blokował neuroprotektoryjnych efektów ACPT-I, zatem wykluczaliśmy udział kinaz PI3-K/Akt w mechanizmie neuroprotektoryjnego działania ortosterycznego agonisty receptorów mGlu grupy III (**Domin i wsp., 2016**).

Ocena neuroprotektoryjnych efektów ACPT-I przeprowadzona była również w modelu *in vivo*, u szczurów zdrowych, jak i obciążonych nadciśnieniem tętniczym, u których wywoływano przejściowe ogniskowe niedokrwienie mózgu przez tymczasowe zamknięcie prawej tętnicy środkowej mózgu (model MCAO, ang. *middle cerebral artery occlusion*) przez okres 90 min, a następnie reperfuzję. Taki model niedokrwienia/reperfuzji prowadzi do uszkodzenia części kory mózgowej i prążkowiec i jest najczęstszym stosowanym modelem przejściowego udaru niedokrwienego (Longa i wsp., 1989; Woodruff i wsp., 2011). Do najważniejszych zalet tej metody należą duża powtarzalność uzyskanych wyników, model najbardziej zbliżony do ludzkiego udaru niedokrwienego, możliwość uniknięcia kraniotomii, wytworzenie penumbry co czyni tą technikę najbardziej odpowiednią do badania przydatności potencjalnych leków neuroprotektoryjnych (Canazza i wsp., 2014). Ocena obszaru uszkodzenia mózgu po 72 godz. od momentu reperfuzji za pomocą barwienia świeżych skrawków chlorkiem trifenylotetrazoliowym (TTC) wykazała, że w naszym modelu *in vivo* zarówno u szczurów normotensyjnych jak i obciążonych nadciśnieniem tętniczym poddanych MCAO nastąpiło częściowe uszkodzenie kory mózgowej i prążkowiec po stronie niedokrwienia (u szczurów normotensyjnych około 37%, a u SHR około 39%), zatem obszar poischemicznego uszkodzenia w obu szczepach zwierząt był podobny (**Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2018**). Ponieważ w modelu *in vitro* wykazaliśmy neuroprotektoryjne efekty ACPT-I podanego w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia ischemii, w modelu *in vivo* związek ten podawaliśmy jednorazowo dootrzewnowo w dawce 30 mg/kg, 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 min po zakończeniu niedokrwienia (w trakcie reperfuzji). Otrzymane wyniki pokazały, że zarówno u szczurów zdrowych normotensyjnych, jak i u szczurów obciążonych nadciśnieniem tętniczym ACPT-I zmniejszał istotnie rozmiary uszkodzenia wywołane przez MCAO zarówno podany 30 min po rozpoczęciu okluzji jak i 30 min po rozpoczęciu reperfuzji (**Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2018**). Ponadto

wykazaliśmy zarówno u szczurów zdrowych jak również u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, że ACPT-I nie tylko zmniejszał obszar uszkodzenia, ale również wpływał na poprawę funkcji motorycznych uszkodzonych przez ischemię. Oceniając sprawność ruchową szczurów w teście CatWalk, służącym do automatycznej i kompleksowej analizy parametrów chodu u gryzoni (ang. *CatWalk automated gait analysis system*), po 72 godz. reperfuzji wykazaliśmy, że zarówno u szczurów normotensyjnych, jak i SHR silnemu uszkodzeniu uległy czasowe parametry chodu takie jak czas podporu (ang. *stand duration*), szybkość przeniesienia łapy (ang. *swing speed*), czas fazy uniesienia łapy (ang. *swing duration*) oraz parametr związany z odległościami między śladami (długość kroku, ang. *stride length*) (**Domin i wsp., 2016; Domin i wsp., 2018**). U szczurów normotensyjnych ACPT-I podany 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 min po zakończeniu niedokrwienia istotnie poprawiał parametry chodu tzn. skracał czas podporu, przyśpieszał czas przeniesienia kończyny oraz wydłużał długość kroku w stosunku do szczurów po samym MCAO. Ponadto zaobserwowaliśmy tendencję do skrócenia czasu uniesienia kończyny, co wszystko razem oznaczałoby szybszy chód (**Domin i wsp., 2016**). U szczurów SHR oprócz powyższych parametrów wykazaliśmy dodatkowo, że ACPT-I podany zarówno 30 min po rozpoczęciu okluzji, jak również 30 min po rozpoczęciu reperfuzji w sposób istotny statystycznie skracał czas przebiegu (ang. *run duration*), a także zwiększał prędkość przebiegu (ang. *run speed*) (**Domin i wsp., 2018**). Działanie protekcyjne ACPT-I wobec ubytków ruchowych wykazaliśmy również w teście otwartego pola (OFT, ang. *open field test*) służącym do oceny spontanicznej aktywności lokomotorycznej. Zaobserwowaliśmy, że ACPT-I podany 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia lub 30 min po rozpoczęciu reperfuzji w sposób istotny statystycznie poprawiał parametry aktywności ruchowej, tzn. zwiększał całkowitą przebytą drogę (ang. *total distance*), a także prędkość (ang. *velocity*) i czas poruszania się (ang. *moving time*) w stosunku do grupy szczurów po samym MCAO, u których te parametry zostały silnie zaburzone, zarówno u zwierząt normotensyjnych (**Domin i wsp., 2016**), jak i SHR (**Domin i wsp., 2018**). Natychmiast po zakończeniu testu OFT, u szczurów nadciśnieniowych ocenialiśmy również sprawność czuciowo-ruchową za pomocą testu odruchowego pozycjonowania przednich łap (ang. *vibrissae-elicited forelimb-placing test*). Zaobserwowaliśmy, że szczury z jednostronnym przejściowym udarem niedokrwinnym miały trudności z odruchowym pozycjonowaniem przedniej łapy po stronie przeciwnej (kontralateralnej) do uszkodzenia. ACPT-I zastosowany 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia istotnie poprawiał odruchowe pozycjonowanie przedniej łapy w stosunku do

grupy szczurów po samym MCAO, jednakże związek ten podany w trakcie reperfuzji nie wykazywał korzystnego efektu na uszkodzone funkcje sensomotoryczne (**Domin i wsp., 2018**). Może to być spowodowane tym, że podczas reperfuzji i reoksygenacji paradoksalnie może dojść do dodatkowych zaburzeń mikrokrążenia oraz uszkodzeń komórek mózgu, a u podstaw tego patologicznego procesu leży generacja wolnych rodników tlenowych i nasilenie procesów zapalnych (Aronowski i wsp., 1997; Eltzschig i Eckle, 2011). Jest wysoce prawdopodobne, że w naszym modelu MCAO u szczurów z nadciśnieniem tętniczym reperfuzja wywołała znaczną dysfunkcję kory baryłkowej w pierwszorzędowej korze somatosensorycznej (czuciowej), obszaru odpowiedzialnego za obieranie sygnału od wibrys zwierzęcia. W korze baryłkowej uszkodzeniu mogły ulec nie tylko komórki nerwowe, ale także astrocyty i komórki śródbłonna naczyń mózgowych tworzące wraz z neuronami tzw. jednostkę neurowaskularną (ang. *neurovascular unit*), co w konsekwencji mogło doprowadzić do upośledzenia regulacji naczyniowej w tym obszarze mózgu. Biorąc pod uwagę fakt, że nadciśnienie tętnicze jest główną przyczyną zaburzeń naczyniowych mózgu (Tayebati i wsp., 2012; Morrison i Filosa, 2019), dodatkowe uszkodzenie regulacji naczyniowej w korze baryłkowej u szczurów SHR w trakcie reperfuzji, mogło mieć istotne znaczenie dla obserwowanego przez nas w tym czasie braku efektu protekcyjnego ACPT-I wobec ubytków czuciowych. Należy podkreślić, że w naszych eksperymentach w modelu MCAO u szczurów obciążonych nadciśnieniem tętniczym po raz pierwszy zastosowaliśmy test odruchowego pozycjonowania przednich łap i zaobserwowaliśmy, że ortosteryczny agonista receptorów mGlu grupy III wpływa na poprawę funkcji czuciowo-ruchowych, ale podany tylko 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia (**Domin i wsp., 2018**).

4.3.2.3. Znaczenie osiągniętych wyników

Uzyskane przez nas wyniki po raz pierwszy pokazały potencjał neuroprotektyny ligandów receptorów mGlu grupy III w eksperymentalnej ischemii, które zostały zastosowane w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia niedokrwienia u dwóch różnych gatunków zwierząt, w modelu *in vitro* na hodowlach mysich, a w modelu *in vivo* na szczurach. Warto podkreślić, że w modelu ischemii *in vivo* ocena neuroprotekcji zarówno histologiczna jak i funkcjonalna prowadzona była nie tylko u szczurów zdrowych, ale również u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, co przybliżyła uzyskane przez nas wyniki do sytuacji pacjentów z udarem mózgu i nadciśnieniem. Ponieważ okno terapeutyczne ma kluczowe znaczenie w określeniu potencjalnej użyteczności klinicznej substancji neuroprotektynowej, odkrycie przez nas, że

ACPT-I podany 30 min po zakończeniu 90 min niedokrwienia nie tylko zmniejszył zakres uszkodzenia, ale również poprawiał stan funkcjonalny zwierząt zarówno normotensyjnych jak i obciążonych nadciśnieniem tętniczym może stanowić ważny krok w poszukiwaniu związków skutecznych w neuroprotekcji w udarze niedokrwinnym mózgu. Istotne z punktu widzenia klinicznego jest też to, że ACPT-I poprawiał parametry chodu, które zostały zaburzone w wyniku ischemii zarówno u szczurów z prawidłowym ciśnieniem krwi, jak również nadciśnieniowych, bowiem odtworzenie i poprawa funkcji chodu jest jednym z głównych celów poudarowej rehabilitacji. Chód pacjentów po udarze charakteryzuje się zmniejszoną prędkością i długością kroku oraz wydłużonym czasem podporu kończyny, a nasze wyniki po raz pierwszy pokazały, że agonista receptorów mGlu grupy III skracał czas podporu, wydłużał długość kroku oraz zwiększał prędkość poruszania się podany po zakończeniu niedokrwienia w czasie reperfuzji. Ma to znaczenie dla potencjalnych możliwości zastosowania takich związków u pacjentów z zaburzeniami chodu, u których leczenie rozpoczyna się zazwyczaj w jakiś czas po udarze, i obejmuje między innymi zmniejszenie niesprawności poudarowej. Nasze wyniki potwierdziły oraz poszerzyły informacje na temat roli receptora mGlu4 w neuroprotekcji w uszkodzeniach ischemicznych mózgu, a także co warto podkreślić, uzyskane przez nas wyniki po raz pierwszy pokazały znaczenie receptora mGlu7 w neuroprotekcji w ischemii. Wciąż istnieje jednak potrzeba syntezy nowych selektywnych ligandów receptorów mGlu o lepszym profilu farmakologicznym, w szczególności mGlu4 oraz mGlu7, aby w pełni ocenić ich potencjalną aktywność neuroprotekcijną w udarze niedokrwinnym mózgu. Warto również podkreślić, że nasze wyniki po raz pierwszy pokazały mechanizmy leżące u podłoża neuroprotekcijnego działania wybranych ligandów receptorów mGlu grupy III w uszkodzeniach ischemicznych, co może być w przyszłości użyteczne do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych.

4.3.3. Metabotropowe receptory Y2 i Y5 jako potencjalne cele terapii neuroprotekcijnej

4.3.3.1. Stan wiedzy

Badania ostatnich kilkadziesiąt lat dostarczają licznych dowodów na neuroprotekcijną rolę NPY w CNS (Silva i wsp. 2005a; Malva i wsp., 2012). Eksperymenty wykonane zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* pokazały neuroprotekcyjne efekty NPY w różnych modelach degeneracji ekscytotoksycznych wywołanych substancjami toksycznymi (Śmiałowska i wsp., 2003; Wu i Li, 2005; Domin i wsp., 2006; Śmiałowska i wsp., 2009; Santos-Carvalho i wsp., 2013), a także w zwierzęcych modelach chorób

neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona (Decressac i wsp., 2012), choroba Alzheimera (Croce i wsp., 2011, 2012, 2013; dos Santos i wsp., 2013), czy też choroba Huntingtona (Decressac i wsp., 2010; Kloster i wsp., 2014; Fatoba i wsp., 2018). W celu sprawdzenia, które z receptorów Y odgrywają rolę w neuroprotekcji przeprowadzono eksperymenty z użyciem agonistów i antagonistów wspomnianych receptorów. Pochodną NPY będącą selektywnym agonistą receptora Y1 jest Leu³¹,Pro³⁴NPY (Fuhlendorff i wsp., 1990), powszechnie używanym agonistą receptora Y2 jest NPY 13-36 (Aguirre i wsp., 1990), natomiast selektywnym agonistą receptora Y5 jest [cPP1-7,NPY19-23,Ala31,Aib32,Gln34] – hPP (Cabrele i wsp., 2000). Jeżeli chodzi o antagonistów receptorów Y to wysoce selektywnym niepeptydowym antagonistą receptora Y1 jest BIBO 3304 (Wieland i wsp., 1998), pierwszym niepeptydowym selektywnym antagonistą receptora Y2 był BIIE0246 (Doods i wsp., 1999), natomiast niepeptydowym wysoce selektywnym antagonistą receptora Y5 jest CGP71683 (Dumont i wsp., 2000). W modelu ekscytotoksyczności *in vitro* przeprowadzonych w organotypowych skrawkach hipokampa szczura Silva i wsp. (2003) postulowali udział receptorów Y1, Y2 oraz Y5 w neuroprotekcji, ponieważ agoniści powyższych receptorów działały neuroprotekcijnie podane 24 godz. przed oraz równocześnie z czynnikiem uszkodzającym. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy neuroprotekcyjne efekty agonistów receptorów Y2 oraz Y5, natomiast nie Y1, w modelach ekscytotoksyczności wywołanej kwasem kainowym *in vitro* w hodowlach z kory mózgowej i hipokampa myszy jak i *in vivo* u szczurów w hipokampie (Śmiałowska i wsp., 2009). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że badani agoniści zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo* wywierali neuroprotekcyjne działanie podane w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia uszkodzenia, co może przybliżyć nasze badania do potrzeb klinicznych. Możliwość neuroprotekcji po opóźnionym, wobec uszkodzenia, podaniu zarówno agonisty receptora Y2 jak i Y5 wykazano również w modelu *in vivo* u myszy, gdzie badane związki zapobiegały pro-apoptotycznym efektom kwasu kainowego podane 8 godz. po zadziałaniu uszkodzenia (Wu i Li, 2005). Agoniści receptora Y2 oraz Y5, ale nie Y1, okazały się być również efektywne w modelu *in vitro* w hodowlach komórek nerwowych siatkówki szczura przeciwko nekrotycznym zmianom wywołanym przez kwas glutaminowy (Santos-Carvalho i wsp., 2013). W tym samym modelu wykazano również, że tylko agonista receptora Y5 przeciwdziałał pro-apoptotycznym efektom kwasu glutaminowego, przy czym efekt ten był całkowicie znoszony przez antagonistę receptora Y5. Co ciekawe, zaangażowanie głównie receptora Y2 wykazano *in vitro* jak i *in vivo* w eksperymentalnych modelach chorób

neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimerera (Rose i wsp., 2009; dos Santos i wsp., 2013), choroba Parkinsona (Decressac i wsp., 2012), czy choroba Huntingtona (Kloster i wsp., 2014; Fatoba i wsp., 2018).

Jak dotąd niewiele było prac poświęconych roli NPY oraz jego pochodnych w ischemii, a istniejące wyniki są niejednoznaczne. W modelu uszkodzenia niedokrwiennego kory u szczurów poddanych MCAO wykazano, iż obszar uszkodzenia znacznie się powiększał, jeśli zwierzętom podano uprzednio dokomorowo oligonukleotyd antysensowny do receptorów Y1, tym samym eliminując działanie NPY poprzez receptor Y1 (Cheung i Cechetto, 2000). Wynik ten przemawia za neuroprotekcijną rolą endogennego NPY w badanym modelu głównie za pośrednictwem receptorów Y1. Istnieją badania pokazujące wzrost immunoreaktywności NPY w obszarze kory mózgowej wokół miejsca uszkodzenia po zamknięciu tętnicy środkowej mózgu u szczura i takie zmiany mogą również wskazywać na neuroprotekcijną rolę endogennego NPY w ischemii (Allen i wsp., 1995; Cheung i wsp., 1995). Jakkolwiek w innych badaniach z użyciem modelu tymczasowego MCAO u szczurów zaobserwowano, iż NPY podany docysternowo lub dokomorowo 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia lub dożylnie na początku reperfuzji, nie tylko nie działał neuroprotekcyjnie, ale powodował zwiększenie się obszaru uszkodzenia (Chen i Cheung, 2002). Uzyskany wynik tłumaczono hemodynamicznymi efektami NPY, kurczącymi naczynia krwionośne, a więc pogarszającymi warunki reperfuzji. W innych eksperymentach ci sami autorzy wykazali, że dokomorowe podanie agonisty receptora Y1, 30 min po rozpoczęciu MCAO u szczurów powiększało obszar uszkodzenia, natomiast zastosowanie antagonisty receptora Y1 działało neuroprotekcyjnie (Chen i Cheung, 2003). Podobne efekty zaobserwowano w modelu *in vitro* w hodowli linii komórkowej poddanych OGD, gdzie podanie agonisty receptora Y1, 1 godz. po czynniku uszkadzającym zwiększało śmiertelność neuronów, natomiast zastosowanie antagonisty receptora Y1 działało neuroprotekcyjnie (Chen i Cheung, 2004). W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że agonista receptora Y2, NPY 13-36, podany 30 min po rozpoczęciu niedokrwienia zmniejszał rozmiar uszkodzenia wywołanego przejściowym MCAO u szczurów (Śmiałowska i wsp., 2009). **Biorąc pod uwagę wysoki potencjał neuroprotekcynny ligandów NPY w uszkodzeniach ekscytotoksycznych, czy też przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych wydaje się być wysoce uzasadnione pogłębienie tematyki badań dotyczącej roli NPY oraz jego pochodnych działających swoiście na receptory Y w eksperymentalnej ischemii, co może być w przyszłości użyteczne do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych.**

4.3.3.2. Omówienie wyników – Potencjalne własności neuroprotektoryjne ligandów receptorów Y2 i Y5 w eksperymentalnej ischemii

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracy Domin i wsp. 2017a.

Celami badawczymi tej części osiągnięć było określenie potencjału neuroprotektoryjnego NPY oraz jego pochodnych pobudzających receptory Y1, Y2 oraz Y5 w modelu eksperymentalnej ischemii *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem podawania związków w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia uszkodzenia ischemicznego. Ponadto zweryfikowanie działania receptorowego testowanych agonistów receptorów Y oraz określenie wewnątrzkomórkowych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania NPY oraz ligandów receptorów Y2 i Y5 w badanym modelu komórkowym.

Model eksperymentalnej ischemii *in vitro* (model OGD) na którym sprawdzaliśmy powyższe hipotezy badawcze został już przeze mnie opisany w punkcie 4.4.2.2. niniejszego autoreferatu. Po 3 godzinach pozbawienia komórek tlenu i glukozy w pierwotnych hodowlach z kory mózgowej myszy obserwowaliśmy około 50% śmiertelność komórkową co wykazaliśmy zarówno w testach LDH jak i MTT (**Domin i wsp., 2017a**). Tak jak już wspominałam wcześniej, zaletą używania w badaniach modelu komórkowego jest możliwość przetestowania dużej ilości związków w stosunkowo krótkim czasie. Do eksperymentów użyliśmy następujących związków: **NPY** – agonista **wszystkich** podtypów receptorów **Y**; **[Leu³¹,Pro³⁴]-NPY** – agonista receptora **Y1**; **NPY 13-36** – agonista receptora **Y2**; **[cPP1-7,NPY19-23,Ala31,Aib32,Gln34]-hPP** – agonista receptora **Y5**; **BIIE0246** – antagonist receptoru **Y2**; **CGP71683** – antagonist receptoru **Y5**. Za pomocą testów LDH jak i MTT zaobserwowaliśmy, że NPY w sposób istotny statystycznie zmniejszał śmiertelność oraz zwiększał przeżywalność neuronów w hodowli podany dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD, a także podany jednorazowo 30 min po zakończeniu OGD. Efektu neuroprotektoryjnego nie zaobserwowaliśmy podając NPY 1 godz. po zakończeniu OGD (**Domin i wsp., 2017a**). W celu sprawdzenia, które receptory dla NPY mogą odgrywać rolę w neuroprotekcji w uszkodzeniach ischemicznych zastosowaliśmy ligandy swoiście pobudzające receptory Y1, Y2 oraz Y5. Przy użyciu testów LDH jak i MTT wykazaliśmy, że zarówno agonista receptora Y2 jak i agonista receptora Y5 zmniejszały śmiertelność i zwiększały przeżywalność neuronów w hodowli podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD, a także podane jednorazowo 30 min po zakończeniu OGD. Efektu ochronnego nie zaobserwowaliśmy podając wyżej wymienionych agonistów 1 godz. po

zakończeniu OGD (**Domin i wsp., 2017a**). Zarówno w testach LDH jak i MTT wykazaliśmy, że efekty neuroprotektoryjne agonistów receptorów Y2 oraz Y5 były znoszone przez zastosowanie antagonistów do tych receptorów. Efektu ochronnego nie zaobserwowaliśmy podając agonistę receptora Y1 (**Domin i wsp., 2017a**). Uzyskane wyniki sugerują zaangażowanie receptorów Y2 oraz Y5 w neuroprotekcję w uszkodzeniu ischemicznym wywołanym OGD, przy czym jak pokazano w Tabeli nr 2 skuteczność opóźnionego leczenia wobec rozpoczęcia ischemii wydaje się być szczególnie obiecująca po aktywacji receptora Y2, ale nie Y5R.

	agonista receptora Y2 (0.1-1 μ M)		agonista receptora Y5 (0.5-1 μ M)	
	LDH	MTT	LDH	MTT
tuż przed + tuż po OGD	24-40%	21-25%	25%	20-23%
30 min po OGD	21-34%	20-24%	∅	16%

Tabela 2. Efekty agonistów receptorów Y2 oraz Y5 na uwalnianie LDH oraz przeżywalność komórek w hodowlach pierwotnych z kory mózgowej poddanych OGD (3 godz.) mierzone testami LDH oraz redukcji MTT i wyrażone jako % zmian kontroli. Brak efektu – ∅.

W celu sprawdzenia wewnątrzkomórkowych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania NPY oraz jego pochodnych działających na receptory Y2 i Y5 w badanym modelu komórkowym ocenialiśmy czy wyżej wymienione związki wpływały na poziom kwasu glutaminowego, uwalnianego w nadmiarze podczas ischemii. Za pomocą metody enzymatycznej mierząc fluorometrycznie poziom uwalniania glutaminianu do medium wykazaliśmy nadmierny wyrzut kwasu glutaminowego 24 godz. po zakończeniu OGD (**Domin i wsp., 2017a**). Ponadto zaobserwowaliśmy, że NPY, jak i agonista receptora Y2 oraz agonista receptora Y5 podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD znacząco zmniejszały uwalnianie glutaminianu, przy czym efekt ten był silniejszy dla NPY oraz agonisty receptora Y2, w porównaniu z agonistą receptora Y5 (**Domin i wsp., 2017a**). Inni autorzy w swoich badaniach również postulowali, że mechanizm neuroprotektoryjnego działania NPY w modelu ekscytotoksyczności jest związany z hamowaniem uwalniania glutaminianu, a u podstaw tego procesu leży towarzyszący pobudzeniu presynaptycznych receptorów Y2 mechanizm osłabiania prądów związanych z napięciowo zależnymi kanałami wapniowymi typu N (Silva i wsp., 2001, 2003).

W świetle powyższych badań stwierdzających, że jednym z możliwych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania NPY jest hamowanie kanałów wapniowych, a tym samym wpływ na homeostazę jonów wapnia w komórce sprawdziliśmy, czy badane związki wpływają na aktywność wapniowo-zależnych proteaz cysteinowych – kalpain, które jak

opisałam w punkcie 4.4.2.2. niniejszego autoreferatu, są zaangażowane w śmierć komórkową indukowaną przez OGD. Przy użyciu metody Western blot wykazaliśmy wzrost aktywności kalpain mierzonej wzrostem ilości produktu rozpadu alfa-spektryny II (145 kDa) 3 godz. po zakończeniu OGD. Ponadto zaobserwowaliśmy, że NPY, jak i agonista receptora Y2 oraz agonista receptora Y5 oraz inhibitor kalpain MDL28170 podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD znamienne obniżały aktywację kalpain indukowaną OGD (**Domin i wsp., 2017a**), sugerując tym samym udział tej ścieżki sygnałowej w mechanizmie neuroprotekcynnego działania badanych związków. W naszym modelu ischemii *in vitro*, oprócz aktywacji kalpain, obserwowaliśmy również istotny wzrost komórek zabarwionych jodkiem propidyny, co wskazywało, że degeneracje w hodowlach poddanych OGD zachodziły głównie poprzez procesy nekrozy (**Domin i wsp., 2017a**). Liczenie komórek zabarwionych PI wykazało, że NPY, jak również agonista receptora Y2, a także agonista receptora Y5 podane dwukrotnie tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu OGD w sposób istotny statystycznie zmniejszały częściowo zmiany nekrotyczne w hodowlach pozbawionych tlenu i glukozy (**Domin i wsp., 2017a**).

4.3.3.3. Znaczenie osiągniętych wyników

Uzyskane wyniki pogłębiły naszą wiedzę na temat roli NPY oraz jego pochodnych działających na receptory Y w eksperymentalnej ischemii. Po raz pierwszy pokazaliśmy neuroprotekcynne działanie NPY, a także agonistów receptorów Y2 oraz Y5 podanych w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia uszkodzenia ischemicznego, przy czym większą efektywność wykazaliśmy po aktywacji receptora Y2. Uzyskane wyniki wskazują, że agonista receptora Y2 może przeciwdziałać niekorzystnym skutkom ischemii podany 30 min po zakończeniu 3 godz. OGD (czyli 3.5 godz. od zainicjowania uszkodzenia) co może mieć znaczenie w potencjalnej użyteczności klinicznej tego typu substancji neuroprotekcynnej. Warto podkreślić, że nasze wyniki po raz pierwszy pokazały mechanizmy neuroprotekcynnego działania agonistów receptora Y2 oraz Y5 w ischemii, co może być w przyszłości użyteczne w opracowaniu skutecznych strategii terapeutycznych w leczeniu niedokrwienia mózgu. Ze względu na korzystne działanie agonistów receptorów Y2 oraz Y5 w ischemii w warunkach *in vitro*, istnieje potrzeba syntezy selektywnych ligandów do tych receptorów, stabilnych metabolicznie, rozpuszczalnych w wodzie oraz przenikających przez barierę krew-mózg, aby w pełni ocenić ich potencjalną aktywność neuroprotekcynną w udarze niedokrwiennym mózgu. Niestety, jak dotąd nie otrzymano małowcząsteczkowych,

penetrujących do mózgu agonistów powyższych receptorów, przez co eksperymenty ograniczone są do kłopotliwych podań domózgowych, co w zasadzie uniemożliwia ich zastosowanie jako potencjalnych substancji leczniczych.

4.3.4. Metabotropowe receptory Y2 i Y5 jako potencjalne cele terapii przeciwdepresyjnej

4.3.4.1. Stan wiedzy

Badania kliniczne pokazują spadek poziomu NPY w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu pacjentów z depresją w porównaniu ze zdrowymi osobami, co sugeruje, że peptyd ten odgrywa istotną rolę w patogenezie depresji, a także istnieją dane pokazujące że NPY ma znaczenie w mechanizmach związanych z leczeniem przeciwdepresyjnym (Wu i wsp., 2011; Gołyszny i Obuchowicz, 2019). Warto podkreślić, że leki przeciwdepresyjne nie tylko mają wpływ na poziomy NPY, ale też redukują gęstość receptorów Y2 w pewnych obszarach mózgu (Widdowson i Halaris, 1991). Co ciekawe istnieją badania pokazujące, że myszy pozbawione receptora Y2 wykazują przeciwdepresyjny fenotyp w porównaniu z myszami kontrolnymi niezależnie od płci i wieku (Tschenett i wsp., 2003; Carvajal i wsp., 2006; Painsipp i wsp., 2008). Od wielu lat trwają badania dostarczające dowodów na przeciwdepresyjne efekty ligandów receptorów Y, jednakże brak małowcząsteczkowych selektywnych związków do poszczególnych podtypów receptorów Y, o lepszym profilu farmakologicznym stwarza poważne ograniczenia w określeniu roli tych receptorów w depresji. Pierwsze badanie pokazujące przeciwdepresyjny potencjał antagonisty receptora Y2 było przeprowadzone przy użyciu związku BIIE0246, który podany dokomorowo jednorazowo powodował istotny wzrost czasu pływania w teście wymuszonego pływania (FST, ang. *Forced Swim Test*) u myszy (Redrobe i wsp., 2002). Dalsze badania z użyciem BIIE0246 wykazały jego aktywność przeciwdepresyjną po wielokrotnych podaniach dokomorowych w teście FST u szczurów w modelu depresji wywołanej usunięciem opuszek węchowych (ang. *olfactory bulbectomized (OBX)*), natomiast takiego efektu nie obserwowano u szczurów kontrolnych (Morales-Medina i wsp., 2012a). Jednakże BIIE0246 ze względu na swoją dużą masę molowa, niskie przenikanie przez barierę krew-mózg, słabą rozpuszczalność w wodzie oraz występowanie działań niepożądanych ma ograniczone zastosowanie jako związek narzędziowy do badania właściwości receptorów Y2 w eksperymentach *in vivo* (Brothers i wsp., 2010; Mittapalli i Roberts, 2014). W miarę dostępności nowych narzędzi farmakologicznych o mniejszej masie molowej i lepszej przenikalności przez barierę krew-mózg w porównaniu z BIIE0246, pojawiło się kolejne doniesienie wskazujące na potencjał

przeciwdepresyjny liganda receptora Y2 w eksperymentalnym modelu depresji. Morales-Medina i wsp. (2012b) wykazali, że antagonistą Y2R, JNJ-31020028, podany wielokrotnie dokomorowo obniżał czas bezruchu w teście FST u szczurów w modelu depresji wywołanej usunięciem opuszek węchowych, natomiast nie wykazywał takiego działania u szczurów kontrolnych.

Badania ostatnich lat wskazują, że spośród receptorów Y, również receptor Y5 może stanowić cel w opracowaniu skutecznych form farmakoterapii w leczeniu depresji. Lu AA33810, scharakteryzowany jako wysoce selektywny antagonistą receptora Y5, przenikający przez barierę krew-mózg wykazywał aktywność przeciwdepresyjną w teście picia sacharozy u szczurów w modelu przewlekłego łagodnego stresu (ang. *chronic mild stress*) po podaniach wielokrotnych dootrzewnowych (Walker i wsp., 2009; Packiarajan i wsp., 2011). Ponadto Walker i wsp. (2009) wykazali, że Lu AA33810 działał przeciwdepresyjnie w teście FST u szczurów Flinders sensitive line (FSL) posiadających fenotyp depresyjny, również po podaniach dootrzewnowych wielokrotnych. My w naszych badaniach przeprowadziliśmy serię pomiarów spektroskopowych, które pozwoliły na określenie struktury molekularnej Lu AA33810 i jego zachowania na granicy faz ciało stałe/roztwór (Pięta i wsp., 2017; Piergies i wsp., 2018), co w przyszłości może być użyteczne w projektowaniu nowych związków o agonistycznym lub antagonistycznym działaniu względem receptora Y5.

Ze względu na fakt, że NPY odgrywa istotną rolę w patogenezie depresji modulując między innymi zaburzoną w tej chorobie równowagę Glu/GABA oraz że receptory Y2 oraz Y5 mogą stanowić ważny punkt uchwytu dla poszukiwania nowych związków o przeciwdepresyjnym działaniu, wydaje się być wysoce uzasadnione pogłębienie dotychczasowych badań, ze szczególnym uwzględnieniem sprawdzenia molekularnych i komórkowych mechanizmów leżących u podłoża przeciwdepresyjnej aktywności ligandów receptorów Y2 oraz Y5.

4.3.4.2. Omówienie wyników – Potencjalne własności przeciwdepresyjne ligandów receptorów Y2 i Y5.

Ta część osiągnięć została opublikowana w pracach Domin i wsp. 2017b oraz Domin i wsp. 2019.

Ponieważ, istotnym jest poszukiwanie nowych leków o przeciwdepresyjnym działaniu o wyższej skuteczności i szybkim czasie działania, celami badawczymi tej części prac było określenie czy wybrane ligandy receptorów Y2 oraz Y5 będą działać przeciwdepresyjnie

po podaniach dootrzewnowych jednorazowych. Ponadto chcieliśmy scharakteryzować nowego, penetrującego do mózgu selektywnego antagonistę receptora Y2 oraz sprawdzić jakie mechanizmy leżą u podłoża przeciwdepresyjnego działania badanych związków.

Model depresji w którym sprawdzaliśmy potencjalne przeciwdepresyjne właściwości antagonisty receptora Y5, Lu AA33810, oparty był na uszkodzeniu funkcji astrocytów, które pełnią kluczową rolę w regulacji równowagi Glu/GABA, wychytując glutaminian uwolniony do przestrzeni synaptycznej (Schousboe, 2003). Na istotną rolę astrocytów w patogenezie depresji wskazują liczne prace zarówno przeprowadzone na zwierzętach, a także pośmiertne analizy histologiczne i biochemiczne mózgow ludzi chorych na depresję, w których wykazano spadek ilości astrocytów, a nawet ich zanik i deficyt ich funkcji w korze przedczołowej i strukturach limbicznych (Banasr i wsp., 2010; Rajkowska i Stockmeier, 2013; Sanacora i Banasr, 2013). Model depresji wywołany uszkodzeniem astrocytów uzyskaliśmy podając obustronnie do kory przedczołowej przyśrodkowej (mPFC, ang. *medial prefrontal cortex*) szczurom szczepu Sprague-Dawley toksynę glejową kwas L-alfa aminoadipinowy (L-AAA) w dawce 100 µg/2µl (**Domin i wsp., 2017b**), według procedury opisanej przez Banasr i Duman (2008) oraz zmodyfikowanej nieznacznie przez nas (Domin i wsp., 2014). Uważa się, że tego typu degeneracje gleju wywołują w mPFC zaburzenie równowagi układów Glu/GABA w kierunku nadczynności glutaminianergicznej co powoduje rozwinięcie się zmian w kierunku depresji. Zachowanie prodepresyjne polegające na istotnym statystycznie wydłużeniu czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania, zwanym również testem Porsolta obserwowaliśmy 72 godz. po drugiej dawce gliotoksyny (**Domin i wsp., 2017b**). Metodą Western blot wykazaliśmy obniżenie poziomu charakterystycznego dla astrocytów glejowego kwaśnego białka włóknikowego GFAP (ang. *Glial fibrillary acidic protein*) o około 50% w korze przedczołowej u szczurów po podaniach gliotoksyny w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Metodą stereologicznego liczenia potwierdziliśmy ten efekt, mianowicie wykazaliśmy około 50% spadek ilości komórek GFAP immunoreaktywnych (GFAP-ir) w mPFC w porównaniu z grupą kontrolną (**Domin i wsp., 2017b**). Lu AA33810 podany dootrzewnowo jednorazowo, w dawce 10 mg/kg, 1 godz. przed testem skracał czas bezruchu w teście Porsolta w porównaniu do grupy szczurów po samej gliotoksynie, wskazując na potencjał antydepresyjny antagonisty receptora Y5 w tym eksperymentalnym modelu depresji (**Domin i wsp., 2017b**). Lu AA33810 w tej samej dawce wykazywał również aktywność przeciwdepresyjną u szczurów nie poddanych uszkodzom gleju, obniżając czas bezruchu w teście FST 1 godz. po podaniu. Stwierdziliśmy, że zarówno

u szczurów nie traktowanych gliotoksyną, jak i w gliotoksynowym modelu depresji Lu AA33810 nie wpływał na aktywność motoryczną zwierząt wskazując tym samym na swoistość wyniku uzyskanego w teście Porsolta (**Domin i wsp., 2017b**).

Zaobserwowaliśmy, że anatomicznym punktem uchwytu Lu AA33810 mogą być między innymi neurony GABA, gdyż wykonując barwienia immunofluorescencyjne wykazałam obecność receptorów Y5 na neuronach GABAergicznym w mPFC (**Domin i wsp., 2017b**). Wynik ten może sugerować, że receptory Y5 mogą odgrywać rolę w regulacji neuronów GABAergicznym. Ponieważ postuluje się, że mechanizm przeciwdepresyjnego działania antagonisty receptora Y5 może polegać na podwyższeniu poziomu NPY (Walker i wsp., 2009), który w korze mózgowej występuje przede wszystkim w lokalnych interneuronach GABAergicznym, gdzie wykazano jego hamującą rolę na transmisję glutaminianergiczną, zatem zastosowanie antagonisty Y5R może podnieść poziom NPY poprzez zahamowanie hamujących neuronów GABA. Tak więc w naszym modelu depresji wywołanej uszkodzeniem gleju, aktywność przeciwdepresyjna Lu AA33810 może być wynikiem pośrednich modulujących działań poprzez interneurony GABA na zaburzony układ Glu/GABA. Warto podkreślić, że w naszym gliotoksynowym modelu depresji przy użyciu metody Western blot wykazaliśmy istotny statystycznie wzrost poziomu białka receptora Y5 w mPFC (**Domin i wsp., 2017b**), który to wzrost może być kompensacyjną reakcją na postulowany spadek funkcji NPY w depresji.

W modelu depresji wywołanej uszkodzeniami gleju zaobserwowaliśmy, że Lu AA33810 nie tylko hamował behawioralne objawy depresji, ale również odwracał efekty molekularne oraz morfologiczne. Identyfikując metodą Western blot poziom astrocytarnego białka GFAP oraz przeprowadzając stereologiczną analizę komórek zabarwionych immunohistochemicznie na obecność GFAP wykazaliśmy, że antagonistą receptora Y5 podany jednorazowo w dawce 10 mg/kg hamował wywołane gliotoksyną uszkodzenia astrocytów w mPFC u szczurów (**Domin i wsp., 2017b**). Uzyskany wynik wskazuje, że Lu AA33810 wywierał bezpośredni korzystny wpływ na morfologię i funkcje astrocytów. Badając wewnątrzkomórkowe mechanizmy przeciwdepresyjnego i glioprotekcyjnego działania Lu AA33810 zwróciliśmy uwagę na szlak sygnalizacyjny BDNF/TrkB, który jak wykazano w innych badaniach jest zaangażowany w patogenezę depresji i potencjalne mechanizmy terapeutyczne (Schmidt i wsp., 2008; Autry i Monteggia, 2012). Ponadto są doniesienia *in vitro* jak i *in vivo* pokazujące modulujący wpływ neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego BDNF (ang. *brain derived neurotrophic factor*) na ekspresję NPY zarówno w normalnych

warunkach jak i w stanach patofizjologicznych (Croll i wsp., 1994; Barnea i Roberts, 2001). W naszym modelu depresji po podaniach gliotoksyny L-AAA zaobserwowaliśmy przy użyciu metody Western blot istotne obniżenie poziomu białek zarówno BDNF, jak i jego receptora TrkB w mPFC u szczurów. Ponadto przy pomocy stereologicznej analizy komórek zabarwionych immunohistochemicznie na obecność BDNF wykazaliśmy około 50% spadek ilości BDNF-ir w mPFC w porównaniu z grupą kontrolną (**Domin i wsp., 2017b**). Lu AA33810 podany dootrzewnowo jednorazowo, w dawce 10 mg/kg odwracał te zmiany, co zaobserwowaliśmy zarówno wykonując analizę Western blot jak i stereologiczną analizę ilości komórek BDNF-ir w mPFC u szczurów (**Domin i wsp., 2017b**), sugerując tym samym udział tej ścieżki sygnałowej w mechanizmie przeciwdepresyjnego i glioprotekcyjnego działania antagonisty receptora Y5.

Spośród ścieżek sygnalizacji komórkowej, które mogą być związane z aktywacją ścieżki BDNF/TrkB, a których zaangażowanie w patofizjologię depresji oraz mechanizm przeciwdepresyjnego działania związków wykazano w licznych doniesieniach są szlaki z udziałem kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K (Duman i wsp., 2007; Zeni i wsp., 2012; Di Benedetto i wsp., 2013). W naszych eksperymentach, w celu sprawdzenia zaangażowania kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K w mechanizm przeciwdepresyjnego działania Lu AA33810, zastosowaliśmy inhibitory powyższych kinaz u szczurów nie traktowanych gliotoksyną, a efekt sprawdziliśmy w teście Porsolta. Zaobserwowaliśmy, że zarówno inhibitor MAPK/ERK, U0126, jak również inhibitor PI3-K, LY294002, podane szczurom dokomorowo 15 min przed Lu AA33810 (10 mg/kg) znosiły przeciwdepresyjne działanie tej substancji, a efekt dotyczył czasu bezruchu (**Domin i wsp., 2017b**). Ponadto wykazaliśmy, że badane związki nie wpływały na aktywność lokomotoryczną zwierząt wskazując tym samym na swoistość wyniku uzyskanego w teście Porsolta. Otrzymane rezultaty świadczą o zaangażowaniu kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K w przeciwdepresyjną aktywność antagonisty receptora Y5. Biorąc pod uwagę doniesienia pokazujące, że stymulacja receptorów Y przy użyciu NPY aktywuje szlaki kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K (Mullins i wsp., 2002; Rosmaninho-Salgado i wsp., 2012; Persaud i Bewick, 2014), w naszych eksperymentach aktywność przeciwdepresyjna związku blokującego receptor Y5 mogła być wynikiem pośrednich modelujących działań podwyższających poziomy NPY. Warto zwrócić uwagę, że receptory Y są różnie rozmieszczone w różnych strukturach mózgu szczura, zarówno pre- jak i postsynaptycznie, a ich aktywacja bądź blokada może angażować rozmaite szlaki

sygnałowe, które mogą leżeć u podstaw przeciwdepresyjnego działania ligandów receptorów Y.

W kolejnej części eksperymentów przeprowadziliśmy charakterystykę spektroskopową, farmakokinetyczną oraz behawioralną nowego przechodzącego przez barierę krew-mózg selektywnego antagonisty receptora Y2, SF-11, który po raz pierwszy został częściowo opisany przez Brothers i wsp. (2010). Ponieważ ze wszystkich typów receptorów Y, najwięcej w mózgu ssaków występuje receptorów Y2, które są zlokalizowane w strukturach korowo-limbicznych, regionach szczególnie zaangażowanych w depresję (Dumont i wsp., 1998), poszukiwanie odpowiednich związków narzędziowych do badania właściwości receptorów Y2 może być w przyszłości użyteczne do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych.

W naszych eksperymentach w celu określenia struktury przestrzennej (konformacji) SF-11 po raz pierwszy przeprowadziliśmy analizę spektroskopową dla tego związku przy użyciu metod spektroskopii oscylacyjnej, takich jak spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz spektroskopia ramanowska (RS), w połączeniu z obliczeniami kwantowo-chemicznymi opartymi na teorii funkcjonału gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*). Zastosowanie metod obliczeniowych umożliwiło wygenerowanie widm teoretycznych (RS i IR) oraz przypisanie pasm dla otrzymanych widm eksperymentalnych (RS i FTIR). W wyniku tych analiz wskazana została zoptymalizowana struktura przestrzenna SF-11 wraz z wykazaniem długości i kątów poszczególnych wiązań chemicznych w jego cząsteczce (Domin i wsp., 2019). Należy zwrócić uwagę, że związki o podobnej strukturze chemicznej, ale różnej strukturze przestrzennej wykazują odmienną aktywność biologiczną (Kubinyi i wsp., 2002; Chhabra i wsp., 2013). Dlatego przestrzenna orientacja poszczególnych wiązań chemicznych badanego związku warunkuje jego aktywność biologiczną i potencjalne terapeutyczne zastosowanie.

Przeprowadzając badania farmakokinetyczne przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC, ang. *High-Performance Liquid Chromatography*) wykazaliśmy, że SF-11 podany dootrzewnowo jednorazowo, w dawce 10 mg/kg największe stężenie w surowicy (~ 3 μM) osiągnął 15 min po podaniu, natomiast w mózgu szczura maksymalne stężenie nastąpiło 30 min pod podaniem (0.47 μM w korze mózgowej oraz 0.49 μM w hipokampie) (Domin i wsp., 2019). Stężenie SF-11 w mózgu szczura, 1 godz. po podaniu nieznacznie zmalało i zanikło po 4-6 godz. od podania. Na podstawie wyników otrzymanych z badań farmakokinetycznych, przeprowadziliśmy eksperymenty behawioralne mające na celu sprawdzenie, czy SF-11 wykazywał potencjalną aktywność przeciwdepresyjną 30 min do

4 godz. od zaaplikowania związku. W teście wymuszonego pływania zaobserwowaliśmy, że SF-11 obniżał w sposób istotny statystycznie czas bezruchu u szczurów podany dootrzewnowo jednorazowo w dawkach 10 mg/kg lub 20 mg/kg, ale nie w dawce 3 mg/kg, 1 godz. przed testem. Aktywności przeciwdepresyjnej nie obserwowaliśmy podając SF-11 30 min lub 4 godz. przed testem, czyli efekt zaniknął wraz ze zmniejszeniem się jego stężenia w mózgu (**Domin i wsp., 2019**). SF-11 we wszystkich badanych dawkach nie wpływał na aktywność lokomotoryczną szczurów wskazując tym samym na swoistość wyników uzyskanych w teście Porsolta (**Domin i wsp., 2019**).

Sprawdziliśmy czy w potencjalne mechanizmy przeciwdepresyjnego działania SF-11 zaangażowane są szlaki sygnalizacyjne z udziałem kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K. Zaobserwowaliśmy, że inhibitor MAPK/ERK, U0126, a także inhibitor PI3-K, LY294002, odwracały przeciwdepresyjne efekty SF-11 w teście wymuszonego pływania u szczurów. Uzyskane wyniki sugerują, że przeciwdepresyjne efekty antagonisty receptora Y2 mogą być związane ze ścieżkami sygnałowymi tych kinaz. W teście aktywności lokomotorycznej nie zaobserwowaliśmy zmian pod wpływem badanych związków, zatem wykazaliśmy swoistość efektów obserwowanych w teście FST (**Domin i wsp., 2019**). Omawiając potencjalny przeciwdepresyjny mechanizm antagonisty receptora Y2, SF-11, należy zwrócić uwagę, że receptory Y2 są głównie receptorami presynaptycznymi hamującymi uwalnianie neuroprzekazników, między innymi NPY (King i wsp., 1999), zatem zablokowanie tych receptorów może podwyższać poziomy NPY w OUN i mieć znaczenie w leczeniu depresji. W naszych eksperymentach po raz pierwszy wykazaliśmy udział kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K w przeciwdepresyjnym działaniu antagonisty receptora Y2, tak więc nie jest wykluczone, że aktywacja tych ścieżek sygnałowych jest związana z nasileniem funkcji NPY.

4.3.4.3. Znaczenie osiągniętych wyników

Uzyskane wyniki po raz pierwszy pokazały potencjał przeciwdepresyjny ligandów receptorów Y2 oraz Y5 po podaniach dootrzewnowych jednorazowych, co może mieć istotne znaczenie przy projektowaniu nowych związków przeciwdepresyjnych o wyższej skuteczności działania. Ponadto zaprezentowane wyniki poszerzyły i pogłębiły naszą wiedzę na temat mechanizmów leżących u podłoża przeciwdepresyjnego działania zarówno antagonisty receptora Y2, jak również antagonisty receptora Y5, tzn. po raz pierwszy wykazaliśmy jakie ścieżki wewnątrzkomórkowego sygnału mogą być zaangażowane w te przeciwdepresyjne efekty. Po raz pierwszy pokazaliśmy przeciwdepresyjną aktywność

antagonisty receptora Y2, SF-11 oraz wyznaczyliśmy jego strukturę molekularną i geometryczną, warunkującą jego aktywność biologiczną i potencjalne terapeutyczne zastosowanie, co może być użyteczne w projektowaniu nowych związków o antagonistycznym działaniu względem receptora Y2. Wciąż bowiem istnieje potrzeba syntezy nowych selektywnych małowcząsteczkowych niepeptydowych ligandów receptorów Y2 oraz Y5, stabilnych metabolicznie, rozpuszczalnych w wodzie oraz penetrujących do mózgu, aby w pełni ocenić rolę tych receptorów w depresji.

4.3.5. Podsumowanie

W cyklu przedstawionych prac opisano potencjalne własności neuroprotektoryjne ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych grupy III oraz ligandów receptorów Y2 i Y5 w eksperymentalnej ischemii, a także potencjalne własności przeciwdepresyjne ligandów receptorów Y2 i Y5. W chorobach OUN takich jak ischemia czy depresja, w których dochodzi do zaburzenia równowagi Glu/GABA, w dalszym ciągu brak jest skutecznego leczenia, dlatego istotne jest poszukiwanie nowych efektywnych strategii terapeutycznych. Nasze badania po raz pierwszy wykazały **potencjał neuroprotektoryjny ligandów receptorów mGlu grupy III w szczególności działających na receptory mGlu4 oraz mGlu7 zastosowanych w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia uszkodzenia ischemicznego**. Efekty neuroprotektoryjne związane były z hamowaniem procesów nekrotycznych, z hamowaniem uwalniania glutaminianu oraz obniżeniem aktywności kalpain. **Potencjał neuroprotektoryjny liganda receptorów mGlu grupy III wykazano nie tylko u szczurów zdrowych, ale również u szczurów po niedokrwieniu z nadciśnieniem tętniczym**, u których nie tylko zmniejszał zakres uszkodzenia, ale również poprawiał stan funkcjonalny zwierząt. Nasze badania po raz pierwszy pokazały **neuroprotektoryjne działanie NPY, a także jego pochodnych działających swoiście na receptory Y2 i Y5 podanych w sposób opóźniony wobec rozpoczęcia uszkodzenia ischemicznego**, przy czym **większą efektywność uzyskano po aktywacji receptora Y2**. Mechanizmy neuroprotektoryjnego działania związane były z hamowaniem procesów nekrotycznych, z hamowaniem uwalniania glutaminianu oraz obniżeniem aktywności kalpain. Nasze badania po raz pierwszy pokazały **potencjał przeciwdepresyjny związków blokujących receptory Y2 oraz Y5 po podaniach dootrzewnowych jednorazowych, a potencjalne mechanizmy ich przeciwdepresyjnego działania związane były ze szlakami sygnałowymi z udziałem kinaz MAPK/ERK oraz PI3-K**. Nasze badania pokazały również **potencjał przeciwdepresyjny i glioprotektoryjny**

antagonisty receptora Y5 w modelu depresji, w którym równowaga Glu/GABA została zaburzona przez dysfunkcję astrocytów. **Potencjalny mechanizm przeciwdepresyjnej aktywności w tym przypadku związany był ze wzrostem ekspresji i działania BDNF.**

Zaprezentowane wyniki mogą pomóc w opracowaniu skutecznych terapii neuroprotekcyjnych i/lub przeciwdepresyjnych oraz wyznaczać kierunki poszukiwań nowych ligandów. Konieczne są bowiem dalsze badania z użyciem nowych selektywnych do odpowiednich receptorów, małowcząsteczkowych, rozpuszczalnych w wodzie, stabilnych metabolicznie, penetrujących do mózgu substancji, aby w pełni ocenić rolę **receptorów mGlu grupy III (w szczególności mGlu4 oraz mGlu7)** oraz **receptorów Y2 i Y5 w neuroprotekcji w ischemii**, a także rolę **receptorów Y2 i Y5 w depresji**.

4.3.6. Wykaz skrótów

(S)-3,4-DCPG – (S)-3,4-Dicarboxyphenylglycine (agonista ortosteryczny mGluR8)

7TMD – (ang. 7 *trans-membrane domains*) domena przeblonowa GPCRs

AC – (ang. *adenyl cyclase*) cyklaza adenylanowa

ACPT-I – (1S,3R,4S)-1-aminocyclo-pentane-1,3,4-tricarboxylic acid (agonista ortosteryczny mGluR grupy III)

AMN082 – N,N'-Bis(diphenylmethyl)-1,2-ethanediamine (allosteryczny agonista mGluR7)

AMPA – receptor pobudzany przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy

BDNF – (ang. *brain derived neurotrophic factor*) neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

BIIE0246 – N-[(1S)-4-[(Aminoiminomethyl)amino]-1-[[[2-(3,5-dioxo-1,2-diphenyl-1,2,4-triazolidin-4-yl)ethyl]amino]carbonyl]butyl]-1-[2-[4-(6,11-dihydro-6-oxo-5H-dibenz[b,e]azepin-11-yl)-1-piperazynyl]-2-oxoethyl]-cyclopentaneacetamide (antagonista receptora Y2)

cAMP – (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) cykliczny adenozymonofosforan

CGP71683 – N-[[trans-4-[[[4-Amino-2-quinazolinyl)amino]methyl]cyclohexyl]methyl]-1-naphthalenesulfonamide (antagonista receptora Y5)

CPPG – (RS)- α -Cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine (antagonista ortosteryczny mGluR grupy III)

CRD – (ang. *cysteine-rich domain*) fragment domeny zewnątrzkomórkowej receptorów mGlu, bogaty w reszty cysteiny

DFT – (ang. *Density Functional Theory*) teoria funkcjonału gęstości

FST – (ang. *Forced Swim Test*) test wymuszonego pływania

FTIR – spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z transformacją Fouriera

GABA – (ang. *gamma-aminobutyric acid*) kwas gamma-amino-masłowy

GFAP – (ang. *Glial fibrillary acidic protein*) glejowe kwaśne białko włókienkowe

Glu – glutaminian / kwas glutaminowy

GPCRs – (ang. *G-protein coupled receptors*) receptory sprzężone z białkami G

HPLC – (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa

iGluR – jonotropowe receptory glutaminianergiczne

- IR** – spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni
- L-AAA** – (ang. *L-alpha-aminoadipic acid*) kwas L-alfa aminoadipinowy
- LDH** – (ang. *lactate dehydrogenase*) dehydrogenaza mleczanowa
- Lu AA33810** – *N-[[trans-4-[(4,5-Dihydro[1]benzothiepieno[5,4-d]thiazol-2-yl)amino]cyclohexyl)methyl]methanesulfonamide* (antagonista receptora Y5)
- LY294002** – *2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one* (inhibitor PI3-K)
- MAPK/ERK** – (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase*) kinaza aktywowana mitogenami/kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
- MCAO** – (ang. *middle cerebral artery occlusion*) tymczasowe zamknięcie prawej tętnicy środkowej mózgu
- MDL28170** – *N-[N-[(Phenylmethoxy)carbonyl]-L-valyl]-phenylalaninal* (inhibitor kalpain)
- mGluR** – metabotropowe receptory glutaminianergiczne
- MMPIP** – *6-(4-Methoxyphenyl)-5-methyl-3-(4-pyridinyl)-isoxazolo[4,5-c]pyridin-4(5H)-one* (allosteryczny antagonist mGluR7)
- mPFC** – (ang. *medial prefrontal cortex*) kora przedczołowa przyśrodkowa
- MTT** – (ang. *3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy
- NAMs** – (ang. *negative allosteric modulators*) negatywne allosteryczne modulatory
- NMDA** – receptor *N*-metylo -D-asparaginowy
- NPY** – neuropeptyd Y
- OFT** – (ang. *open field test*) test otwartego pola
- OGD** – (ang. *oxygen and glucose deprivation*) model niedokrwienia *in vitro*, w którym komórki poddawane są deprywacji tlenu i glukozy
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- PAMs** – (ang. *positive allosteric modulators*) pozytywne allosteryczne modulatory
- PHCCC** – *N-Phenyl-7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxamide* (mGluR4 PAM)
- PI** – (ang. *propidium iodide*) jodek propidyny
- PI3-K** – (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase*) kinaza fosfatydylo-3-inozytolu
- PKA** – (ang. *protein kinase A*) kinaza białkowa A
- PKC** – (ang. *protein kinase C*) kinaza białkowa C
- PLC** – (ang. *phospholipase C*) fosfolipaza C
- RS** – spektroskopia ramanowska
- SF-11** – *N-(4-Ethoxyphenyl)-4-(hydroxydiphenylmethyl)-1-piperidinecarbothioamide* (antagonista receptora Y2)
- SHR** – (ang. *spontaneously hypertensive rat*) szczury z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym
- TrkB** – (ang. *Tropomyosin receptor kinase B* lub *tyrosine receptor kinase B*) receptor dla BDNF
- TTC** – (ang. *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*) chlorek trifenylotetrazoliowy
- U0126** – *1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene* (inhibitor MAPK/ERK)
- VFTD** – (ang. *Venus Flytrap domain*) fragment zewnątrzkomórkowej domeny receptorów mGlu, zawierający miejsce ortosetryczne
- VU0155041** – *cis-2-[[[(3,5-Dichlorophenyl)amino]carbonyl]cyclohexanecarboxylic acid* (mGluR4 PAM)
- YR** – receptory Y

4.3.7. Piśmiennictwo

1. Aguirre JA, Fuxe K, Agnati LF, von Euler G. Centrally injected neuropeptide Y (13-36) produces vasopressor effects and antagonizes the vasodepressor action of neuropeptide Y (1-36) in the awake male rat. *Neurosci Lett*. 1990, 118, 5-8.
2. Allen GV, Cheung RT, Cechetto DF. Neurochemical changes following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroscience*. 1995, 68, 1037-1050.
3. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997, 17, 1048-1056.
4. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev*. 2012, 64, 238-258.
5. Azam S, Haque ME, Jakaria M, Jo SH, Kim IS, Choi DK. G-Protein-Coupled Receptors in CNS: A Potential Therapeutic Target for Intervention in Neurodegenerative Disorders and Associated Cognitive Deficits. *Cells*. 2020, 9, 506.
6. Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry*. 2010, 15, 501-511.
7. Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry*. 2008, 64, 863-870.
8. Barnea A, Roberts J. Induction of functional and morphological expression of neuropeptide Y (NPY) in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor (BDNF): evidence for a requirement for extracellular-regulated kinase (ERK)-dependent and ERK-independent mechanisms. *Brain Res*. 2001, 919, 57-69.
9. Battaglia G, Busceti CL, Molinaro G, Biagioni F, Traficante A, Nicoletti F, Bruno V. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci*. 2006, 26, 7222-7229.
10. Betts MJ, O'Neill MJ, Duty S. Allosteric modulation of the group III mGlu4 receptor provides functional neuroprotection in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*. 2012, 166, 2317-2330.
11. Brothers SP, Saldanha SA, Spicer TP, Cameron M, Mercer BA, Chase P, McDonald P, Wahlestedt C, Hodder PS. Selective and brain penetrant neuropeptide y y2 receptor antagonists discovered by whole-cell high-throughput screening. *Mol Pharmacol*. 2010, 77, 46-57.
12. Brothers SP, Wahlestedt C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Mol Med*. 2010, 2, 429-439.
13. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001, 21, 1013-1033.
14. Bruno V, Battaglia G, Ksiazek I, van der Putten H, Catania MV, Giuffrida R, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Gasparini F, Kuhn R, Hampson DR, Nicoletti F, Flor PJ. Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci*. 2000, 20, 6413-6420.
15. Bruno V, Caraci F, Copani A, Matrisciano F, Nicoletti F, Battaglia G. The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: A "dark side" in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. *Neuropharmacology*. 2017, 115, 180-192.
16. Bruno V, Copani A, Bonanno L, Knoepfel T, Kuhn R, Roberts PJ, Nicoletti F. Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures *Eur J Pharmacol*. 1996, 310, 61-66.
17. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics*. 2009, 6, 94-107.
18. Cabrele C, Langer M, Bader R, Wieland HA, Doods HN, Zerbe O, Beck-Sickinger AG. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*. 2000, 275, 36043-36048.
19. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol*. 2014, 5, 19.
20. Caraci F, Molinaro G, Battaglia G, Giuffrida ML, Rizzo B, Traficante A, Bruno V, Cannella M, Merlo S, Wang X, Heinz BA, Nisenbaum ES, Britton TC, Drago F, Sortino MA, Copani A, Nicoletti F. Targeting group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors for the treatment of psychosis associated with

- Alzheimer's disease: selective activation of mGlu2 receptors amplifies beta-amyloid toxicity in cultured neurons, whereas dual activation of mGlu2 and mGlu3 receptors is neuroprotective. *Mol Pharmacol*. 2011, 79, 618-626.
21. Carvajal C, Dumont Y, Herzog H, Quirion R. Emotional behavior in aged neuropeptide Y (NPY) Y2 knockout mice. *J Mol Neurosci*. 2006, 28, 239-245.
 22. Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circ Res*. 2017, 120, 541-558.
 23. Célanire S, Campo B. Recent advances in the drug discovery of metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) activators for the treatment of CNS and non-CNS disorders. *Expert Opin Drug Discov*. 2012, 7, 261-280.
 24. Chaitanya GV, Babu PP. Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem Res*. 2008, 33, 2178-2186.
 25. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. 2016, 15, 869-881.
 26. Chen SH, Cheung RT. Intracerebroventricular injection of a neuropeptide Y-Y1 receptor agonist increases while BIBP3226, a Y1 antagonist, reduces the infarct volume following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience*. 2003, 116, 119-126.
 27. Chen SH, Cheung RT. Neuropeptide Y-Y1 receptor agonist worsens while antagonist improves survival of cultured Y1-expressing neuronal cells following oxygen and glucose deprivation. *J Biomed Sci*. 2004, 11, 781-788.
 28. Chen SH, Cheung RT. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume. *Brain Res*. 2002, 927, 138-143.
 29. Cheung RT, Cechetto DF. Neuropeptide Y-Y1 receptor antisense oligodeoxynucleotide increases the infarct volume after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience*. 2000, 98, 771-777.
 30. Cheung RT, Diab T, Cechetto DF. Time-course of neuropeptide changes in peri-ischemic zone and amygdala following focal ischemia in rats. *J Comp Neurol*. 1995, 360, 101-120.
 31. Chhabra N, Aseri ML, Padmanabhan D. A review of drug isomerism and its significance. *Int J Appl Basic Med Res*. 2013, 3, 16-18.
 32. Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*. 1985, 15, 1159-1181.
 33. Colmers WF. Modulation of synaptic transmission in hippocampus by neuropeptide Y: presynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci*. 1990, 611, 206-218.
 34. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2009, 8, 41-54.
 35. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997, 37, 205-237.
 36. Croce N, Ciotti MT, Gelfo F, Cortelli S, Federici G, Caltagirone C, Bernardini S, Angelucci F. Neuropeptide Y protects rat cortical neurons against β -amyloid toxicity and re-establishes synthesis and release of nerve growth factor. *ACS Chem Neurosci*. 2012, 3, 312-318.
 37. Croce N, Dinallo V, Ricci V, Federici G, Caltagirone C, Bernardini S, Angelucci F. Neuroprotective effect of neuropeptide Y against β -amyloid 25-35 toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with increased neurotrophin production. *Neurodegener Dis*. 2011, 8, 300-309.
 38. Croce N, Gelfo F, Ciotti MT, Federici G, Caltagirone C, Bernardini S, Angelucci F. NPY modulates miR-30a-5p and BDNF in opposite direction in an in vitro model of Alzheimer disease: a possible role in neuroprotection? *Mol Cell Biochem*. 2013, 376, 189-195.
 39. Croll SD, Wiegand SJ, Anderson KD, Lindsay RM, Nawa H. Regulation of neuropeptides in adult rat forebrain by the neurotrophins BDNF and NGF. *Eur J Neurosci*. 1994, 6, 1343-1353.
 40. Czéh B, Simon M. Benefits of animal models to understand the pathophysiology of depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020, 110049.
 41. Decressac M, Pain S, Chabeauti PY, Frangeul L, Thiriet N, Herzog H, Vergote J, Chalon S, Jaber M, Gaillard A. Neuroprotection by neuropeptide Y in cell and animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2012, 33, 2125-2137.
 42. Decressac M, Wright B, Tyers P, Gaillard A, Barker RA. Neuropeptide Y modifies the disease course in the R6/2 transgenic model of Huntington's disease. *Exp Neurol*. 2010, 226, 24-32.
 43. Di Benedetto B, Radecke J, Schmidt MV, Rupprecht R. Acute antidepressant treatment differently modulates ERK/MAPK activation in neurons and astrocytes of the adult mouse prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2013, 232, 161-168.

44. Domin H, Gołębiewska K, Jantas D, Kamińska K, Zięba B, Śmiałowska M. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo. *Neurotox Res.* 2014, 26, 99-113.
45. Domin H, Jantas D, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of the allosteric agonist of metabotropic glutamate receptor 7 AMN082 on oxygen-glucose deprivation- and kainate-induced neuronal cell death. *Neurochem Int.* 2015, 88, 110-123.
46. Domin H, Kajta M, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of MTEP, a selective mGluR5 antagonists and neuropeptide Y on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. *Pharmacol Rep.* 2006, 58, 846-858.
47. Domin H, Szewczyk B, Woźniak M, Wawrzak-Wleciał A, Śmiałowska M. Antidepressant-like effect of the mGluR5 antagonist MTEP in an astroglial degeneration model of depression. *Behav Brain Res.* 2014, 273, 23-33.
48. Domin H, Zięba B, Gołębiewska K, Kowalska M, Dziubina A, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of mGluR5 antagonist MTEP: effects on kainate-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Pharmacol Rep.* 2010, 62, 1051-1061.
49. Doods H, Gaida W, Wieland HA, Dollinger H, Schnorrenberg G, Esser F, Engel W, Eberlein W, Rudolf K. BIIIE0246: a selective and high affinity neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1999, 384, R3-5.
50. dos Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues AL, Farina M, De Lima TC, Prediger RD. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β (1-40)) administration in mice. *Behav Brain Res.* 2013, 244, 107-115.
51. Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, Russell DS, Duman RS. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 2007, 61, 661-670.
52. Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Fournier A, Quirion R. Potent and selective tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIB03304 (Y1) and CGP71683A (Y5). *Can J Physiol Pharmacol.* 2000, 78, 116-125.
53. Dumont Y, Jacques D, Bouchard P, Quirion R. Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains. *J Comp Neurol.* 1998, 402, 372-384.
54. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007, 87, 179-197.
55. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011, 17, 1391-1401.
56. Engers DW, Lindsley CW. Allosteric modulation of Class C GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Drug Discov Today Technol.* 2013, 10, e269-276.
57. Fatoba O, Kloster E, Reick C, Saft C, Gold R, Epplen JT, Arning L, Ellrichmann G. Activation of NPY-Y2 receptors ameliorates disease pathology in the R6/2 mouse and PC12 cell models of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2018, 302, 112-128.
58. Ferraguti F, Baldani-Guerra B, Corsi M, Nakanishi S, Corti C. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 2 by metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 2073-2082.
59. Flor PJ, Acher FC. Orthosteric versus allosteric GPCR activation: the great challenge of group-III mGluRs. *Biochem Pharmacol.* 2012, 84, 414-424.
60. Flor PJ, Battaglia G, Nicoletti F, Gasparini F, Bruno V. Neuroprotective activity of metabotropic glutamate receptor ligands. *Adv Exp Med Biol.* 2002, 513, 197-223.
61. Folbergrová J, Druga R, Haugvicová R, Mares P, Otáhal J. Anticonvulsant and neuroprotective effect of (S)-3,4-dicarboxyphenylglycine against seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neuropharmacology.* 2008, 54, 665-675.
62. Fuhlendorff J, Gether U, Aakerlund L, Langeland-Johansen N, Thøgersen H, Melberg SG, Olsen UB, Thastrup O, Schwartz TW. [Leu31, Pro34]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87, 182-186.
63. Gasparini F, Bruno V, Battaglia G, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Laurie D, Sommer B, Varney MA, Hess SD, Johnson EC, Kuhn R, Urwyler S, Sauer D, Portet C, Schmutz M, Nicoletti F, Flor PJ. (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999, 289, 1678-1687.
64. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 1993, 13, 3510-3524.
65. Gołyszny M, Obuchowicz E. Are neuropeptides relevant for the mechanism of action of SSRIs? *Neuropeptides.* 2019, 75, 1-17.

66. Gray TS, Morley JE. Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* 1986, 38, 389-401.
67. Greber S, Schwarzer C, Sperk G. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br J Pharmacol.* 1994, 113, 737-740.
68. Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 2001, 294, 1024-1030.
69. Gregory KJ, Noetzel MJ, Niswender CM. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators: structural basis and therapeutic potential for CNS disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013, 115, 61-121.
70. Gururajan A, Reif A, Cryan JF, Slattery DA. The future of rodent models in depression research. *Nat Rev Neurosci.* 2019, 20, 686-701.
71. Hellyer S, Leach K, Gregory KJ. Neurobiological insights and novel therapeutic opportunities for CNS disorders from mGlu receptor allosteric and biased modulation. *Curr Opin Pharmacol.* 2017, 32, 49-55.
72. Henrich-Noack P, Flor PJ, Sabelhaus CF, Prass K, Dirnagl U, Gasparini F, Sauter A, Rudin M, Reymann KG. Distinct influence of the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine [(R,S)-PPG] on different forms of neuronal damage. *Neuropharmacology.* 2000, 39, 911-917.
73. Hovelsø N, Sotty F, Montezinho LP, Pinheiro PS, Herrik KF, Mørk A. Therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulators. *Curr Neuropharmacol.* 2012, 10, 12-48.
74. Iacovelli L, Bruno V, Salvatore L, Melchiorri D, Gradini R, Caricasole A, Barletta E, De Blasi A, Nicoletti F. Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem.* 2002, 82, 216-223.
75. Iderberg H, Maslava N, Thompson AD, Bubser M, Niswender CM, Hopkins CR, Lindsley CW, Conn PJ, Jones CK, Cenci MA. Pharmacological stimulation of metabotropic glutamate receptor type 4 in a rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia: Comparison between a positive allosteric modulator and an orthosteric agonist. *Neuropharmacology.* 2015, 95, 121-129.
76. Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 2002, 1, 383-386.
77. Jantas D, Greda A, Gołda S, Korostynski M, Grygier B, Roman A, Pilc A, Lason W. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP(+)-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: the impact of cell differentiation state. *Neuropharmacology.* 2014, 83, 36-53.
78. Jantas D, Gręda A, Gołda S, Korostyński M, Lasoń W. The neuroprotective effects of orthosteric agonists of group II and III mGluRs in primary neuronal cell cultures are dependent on developmental stage. *Neuropharmacology* 2016, 111, 195-211.
79. Jantas D, Greda A, Leskiewicz M, Grygier B, Pilc A, Lason W. Neuroprotective effects of mGluR II and III activators against staurosporine- and doxorubicin-induced cellular injury in SH-SY5Y cells: New evidence for a mechanism involving inhibition of AIF translocation. *Neurochem Int.* 2015, 88, 124-137.
80. Jantas D, Lech T, Gołda S, Pilc A, Lasoń W. New evidences for a role of mGluR7 in astrocyte survival: Possible implications for neuroprotection. *Neuropharmacology.* 2018, 141, 223-237.
81. Jones CK, Bubser M, Thompson AD, Dickerson JW, Turle-Lorenzo N, Amalric M, Blobaum AL, Bridges TM, Morrison RD, Jadhav S, Engers DW, Italiano K, Bode J, Daniels JS, Lindsley CW, Hopkins CR, Conn PJ, Niswender CM. The metabotropic glutamate receptor 4-positive allosteric modulator VU0364770 produces efficacy alone and in combination with L-DOPA or an adenosine 2A antagonist in preclinical rodent models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012, 340, 404-421.
82. Jones CK, Engers DW, Thompson AD, Field JR, Blobaum AL, Lindsley SR, Zhou Y, Gogliotti RD, Jadhav S, Zamorano R, Bogenpohl J, Smith Y, Morrison R, Daniels JS, Weaver CD, Conn PJ, Lindsley CW, Niswender CM, Hopkins CR. Discovery, synthesis, and structure-activity relationship development of a series of N-4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenylpicolinamides (VU0400195, ML182): characterization of a novel positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGlu(4)) with oral efficacy in an antiparkinsonian animal model. *J Med Chem.* 2011, 54, 7639-7647.
83. Karsy M, Brock A, Guan J, Taussky P, Kalani MY, Park MS. Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurg Focus.* 2017, 42, E3.
84. King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G. Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem.* 1999, 73, 641-646.
85. Kloster E, Saft C, Akkad DA, Epplen JT, Arning L. Association of age at onset in Huntington disease with functional promoter variations in NPY and NPY2R. *J Mol Med (Berl).* 2014, 92, 177-184.
86. Komatsu H. Novel Therapeutic GPCRs for Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci.* 2015, 16, 14109-14121.
87. Kubinyi H. Chemical Similarity and Biological Activities. *J Braz Chem Soc.* 2002, 13, 717-726.

88. Lafon-Cazal M, Fagni L, Guiraud MJ, Mary S, Lerner-Natoli M, Pin JP, Shigemoto R, Bockaert J. mGluR7-like metabotropic glutamate receptors inhibit NMDA-mediated excitotoxicity in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 663-672.
89. Lea PM 4th, Faden AI. Modulation of metabotropic glutamate receptors as potential treatment for acute and chronic neurodegenerative disorders. *Drug News Perspect.* 2003, 16, 513-522.
90. Litim N, Morissette M, Di Paolo T. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research. *Neuropharmacology.* 2017, 115, 166-179.
91. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989, 20, 84-91.
92. Maj M, Bruno V, Dragic Z, Yamamoto R, Battaglia G, Inderbitzin W, Stoehr N, Stein T, Gasparini F, Vranesic I, Kuhn R, Nicoletti F, Flor PJ. (-)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacology.* 2003, 45, 895-906.
93. Malagelada C, Xifró X, Miñano A, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis.* 2005, 20, 27-37.
94. Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, Silva AP. Multifaces of neuropeptide Y in the brain--neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides.* 2012, 46, 299-308.
95. Marino MJ, Williams DL Jr, O'Brien JA, Valenti O, McDonald TP, Clements MK, Wang R, DiLella AG, Hess JF, Kinney GG, Conn PJ. Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100, 13668-13673.
96. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 1998, 46, 281-309.
97. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev.* 1998, 50, 143-150.
98. Mitchell ND, Baker GB. An update on the role of glutamate in the pathophysiology of depression. *Acta Psychiatr Scand.* 2010, 122, 192-210.
99. Mitsukawa K, Yamamoto R, Ofner S, Nozulak J, Pescott O, Lukic S, Stoehr N, Mombereau C, Kuhn R, McAllister KH, van der Putten H, Cryan JF, Flor PJ. A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102, 18712-18717.
100. Mittapalli GK, Roberts E. Ligands of the neuropeptide Y Y2 receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014, 24, 430-441.
101. Morales-Medina JC, Dumont Y, Benoit CE, Bastianetto S, Flores G, Fournier A, Quirion R. Role of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors on behavioral despair in a rat model of depression with co-morbid anxiety. *Neuropharmacology.* 2012a, 62, 200-208.
102. Morales-Medina JC, Dumont Y, Bonaventure P, Quirion R. Chronic administration of the Y2 receptor antagonist, JNJ-31020028, induced anti-depressant like-behaviors in olfactory bulbectomized rat. *Neuropeptides.* 2012b, 46, 329-334.
103. Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res.* 2010, 1314, 194-205.
104. Morrison HW, Filosa JA. Stroke and the neurovascular unit: glial cells, sex differences, and hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019, 316, C325-C339.
105. Motolese M, Mastroiacovo F, Cannella M, Bucci D, Gaglione A, Rizzo B, Lütjens R, Poli SM, Celanire S, Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F. Targeting type-2 metabotropic glutamate receptors to protect vulnerable hippocampal neurons against ischemic damage. *Mol Brain.* 2015, 8, 66.
106. Moyanova SG, Mastroiacovo F, Kortenska LV, Mitreva RG, Fardone E, Santolini I, Sobrado M, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Ngomba RT. Protective role for type 4 metabotropic glutamate receptors against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011, 31, 1107-1118.
107. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke.* 1995, 26, 503-513.
108. Muir KW, Lees KR. Excitatory amino acid antagonists for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003, (3), CD001244.
109. Mullins DE, Zhang X, Hawes BE. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y(1), Y(2), Y(4) and Y(5) receptor subtypes. *Regul Pept.* 2002, 105, 65-73.
110. Nakagawa Y, Shiosaka S, Emson PC, Tohyama M. Distribution of neuropeptide Y in the forebrain and diencephalon: an immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 1985, 361, 52-60.

111. Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem.* 1993, 268, 11868-11873.
112. Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Buchan AM. Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility. *Brain.* 2017, 140, 2079-2092.
113. Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM, Hayes RL. Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001, 21, 1281-1294.
114. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci.* 1996, 19, 267-271.
115. Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 2001, 69, 369-381.
116. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010, 50, 295-322.
117. Niswender CM, Johnson KA, Weaver CD, Jones CK, Xiang Z, Luo Q, Rodriguez AL, Marlo JE, de Paulis T, Thompson AD, Days EL, Nalywajko T, Austin CA, Williams MB, Ayala JE, Williams R, Lindsley CW, Conn PJ. Discovery, characterization, and antiparkinsonian effect of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 4. *Mol Pharmacol.* 2008, 74, 1345-1358.
118. Nozohouri S, Sifat AE, Vaidya B, Abbruscato TJ. Novel approaches for the delivery of therapeutics in ischemic stroke. *Drug Discov Today.* 2020, 25, 535-551.
119. Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology.* McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, eds., 1978, pp. 95-121, Raven Press, New York.
120. Packiarajan M, Marzabadi MR, Desai M, Lu Y, Noble SA, Wong WC, Jubian V, Chandrasena G, Wolinsky TD, Zhong H, Walker MW, Wiborg O, Andersen K. Discovery of Lu AA33810: a highly selective and potent NPY5 antagonist with in vivo efficacy in a model of mood disorder. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011, 21, 5436-5441.
121. Painsipp E, Herzog H, Holzer P. Implication of neuropeptide-Y Y2 receptors in the effects of immune stress on emotional, locomotor and social behavior of mice. *Neuropharmacology.* 2008, 55, 117-126.
122. Pedata F, Dettori I, Coppi E, Melani A, Fusco I, Corradetti R, Pugliese AM. Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology.* 2016, 104, 105-130.
123. Persaud SJ, Bewick GA. Peptide YY: more than just an appetite regulator. *Diabetologia.* 2014, 57, 1762-1769.
124. Piergies N, Pięta E, Paluszkiwicz C, Domin H, Kwiatek WM. Polarization effect in tip-enhanced infrared nanospectroscopy studies of the selective Y5 receptor antagonist Lu AA33810. *Nano Research.* 2018, 11, 4401-4411.
125. Pięta E, Piergies N, Oćwieja M, Domin H, Paluszkiwicz C, Bielańska E, Kwiatek WM. Monitoring the Interfacial Behavior of Selective Y5 Receptor Antagonist on Colloidal Gold Nanoparticle Surfaces: Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy Studies. *J. Phys. Chem. C.* 2017, 121, 17276-17288.
126. Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 1995, 34, 1-26.
127. Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2013, 105, 24-48.
128. Rajah GB, Ding Y. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: a concise review. *Neurosurg Focus.* 2017, 42, E2.
129. Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets.* 2013, 14, 1225-1236.
130. Redrobe JP, Dumont Y, Fournier A, Quirion R. The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology.* 2002, 26, 615-624.
131. Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RG, Olmo RP, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res.* 2017, 115, 179-191.
132. Rose JB, Crews L, Rockenstein E, Adame A, Mante M, Hersh LB, Gage FH, Spencer B, Potkar R, Marr RA, Masliah E. Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. Version 2. *J Neurosci.* 2009, 29, 1115-1125.
133. Rosmaninho-Salgado J, Cortez V, Estrada M, Santana MM, Gonçalves A, Marques AP, Cavadas C. Intracellular mechanisms coupled to NPY Y2 and Y5 receptor activation and lipid accumulation in murine adipocytes. *Neuropeptides.* 2012, 46, 359-366.

134. Sabelhaus CF, Schröder UH, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG. Neuroprotection against hypoxic/hypoglycaemic injury after the insult by the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R, S)-4-phosphonophenylglycine. *Br J Pharmacol.* 2000, 131, 655-658.
135. Sanacora G, Banasr M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2013, 73, 1172-1179.
136. Sanacora G, Rothman DL, Mason G, Krystal JH. Clinical studies implementing glutamate neurotransmission in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, 1003, 292-308.
137. Santos-Carvalho A, Elvas F, Alvaro AR, Ambrósio AF, Cavadas C. Neuropeptide Y receptors activation protects rat retinal neural cells against necrotic and apoptotic cell death induced by glutamate. *Cell Death Dis.* 2013, 4, e636.
138. Schmidt HD, Banasr M, Duman RS. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2008, 5, 151-156.
139. Schousboe A. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res.* 2003, 28, 347-352.
140. Shende P, Desai D. Physiological and Therapeutic Roles of Neuropeptide Y on Biological Functions. *Adv Exp Med Biol.* 2020, 1237, 37-47.
141. Silva AP, Carvalho AP, Carvalho CM, Malva JO. Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus. *J Neurochem.* 2001, 79, 286-296.
142. Silva AP, Pinheiro PS, Carvalho AP, Carvalho CM, Jakobsen B, Zimmer J, Malva JO. Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB J.* 2003, 17, 1118-1120.
143. Silva AP, Xapelli S, Grouzmann E, Cavadas C. The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005a, 4, 331-347.
144. Silva AP, Xapelli S, Pinheiro PS, Ferreira R, Lourenço J, Cristóvão A, Grouzmann E, Cavadas C, Oliveira CR, Malva JO. Up-regulation of neuropeptide Y levels and modulation of glutamate release through neuropeptide Y receptors in the hippocampus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurochem.* 2005b, 93, 163-170.
145. Smiałowska M, Domin H, Zieba B, Koźniewska E, Michalik R, Piotrowski P, Kajta M. Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo. *Neuropeptides.* 2009, 43, 235-249.
146. Śmiałowska M, Gołmbiowska 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, 379-392.
147. Smiałowska M, Wierońska JM, Szewczyk B. Neuroprotective effect of NPY on kainate neurotoxicity in the hippocampus. *Pol J Pharmacol.* 2003, 55, 979-986.
148. Tayebati SK, Tomassoni D, Amenta F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *J Neurol Sci.* 2012, 322, 241-249.
149. Tschenett A, Singewald N, Carli M, Balducci C, Salchner P, Vezzani A, Herzog H, Sperk G. Reduced anxiety and improved stress coping ability in mice lacking NPY-Y2 receptors. *Eur J Neurosci.* 2003, 18, 143-148.
150. Walker MW, Wolinsky TD, Jubian V, Chandrasena G, Zhong H, Huang X, Miller S, Hegde LG, Marsteller DA, Marzabadi MR, Papp M, Overstreet DH, Gerald CP, Craig DA. The novel neuropeptide Y Y5 receptor antagonist Lu AA33810 [N-[[trans-4-[(4,5-dihydro[1]benzothiepieno[5,4-d]thiazol-2-yl)amino]cyclohexyl]methyl]-methanesulfonamide] exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects in rat models of stress sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, 328, 900-911.
151. Walther C, Mörl K, Beck-Sickinger AG. Neuropeptide Y receptors: ligand binding and trafficking suggest novel approaches in drug development. *J Pept Sci.* 2011, 17, 233-246.
152. Wang WY, Wang H, Luo Y, Jia LJ, Zhao JN, Zhang HH, Ma ZW, Xue QS, Yu BW. The effects of metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist N,N'-dibenzhydrylethane-1,2-diamine dihydrochloride on developmental sevoflurane neurotoxicity: role of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Neuroscience.* 2012, 205, 167-177.
153. Widdowson PS, Halaris AE. Chronic desipramine treatment reduces regional neuropeptide Y binding to Y2-type receptors in rat brain. *Brain Res.* 1991, 539, 196-202.
154. Wieland HA, Engel W, Eberlein W, Rudolf K, Doods HN. Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents. *Br J Pharmacol.* 1998, 125, 549-555.
155. Wierońska JM, Pilc A. Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs. *Neurochem Int.* 2009, 55, 85-97.

156. Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener.* 2011, 6, 11.
157. Wu G, Feder A, Wegener G, Bailey C, Saxena S, Charney D, Mathé AA. Central functions of neuropeptide Y in mood and anxiety disorders. *Expert Opin Ther Targets.* 2011, 15, 1317-1331.
158. Wu YF, Li SB. Neuropeptide Y expression in mouse hippocampus and its role in neuronal excitotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2005, 26, 63-68.
159. Xu SY, Pan SY. The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy. *Med Sci Monit Basic Res.* 2013, 19, 37-45.
160. Zeni AL, Zomkowski AD, Maraschin M, Rodrigues AL, Tasca CI. Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. *Biochem Behav.* 2012, 103, 181-186.
161. Zhang FF, Peng W, Sweeney JA, Jia ZY, Gong QY. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. *CNS Neurosci Ther.* 2018, 24, 994-1003.
162. Zhou Z, Lu J, Liu WW, Manaenko A, Hou X, Mei Q, Huang JL, Tang J, Zhang JH, Yao H, Hu Q. Advances in stroke pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2018, 191, 23-42.
163. Zhu K, He Q, Li L, Zhao Y, Zhao J. Silencing thioredoxin1 exacerbates damage of astrocytes exposed to OGD/R by aggravating apoptosis through the Actin-Ras2-cAMP-PKA pathway. *Int J Neurosci.* 2018, 128, 512-519.

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

5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Od 2003 rok, po zdaniu egzaminu kwalifikacyjnego zostałam uczestnikiem Studium Doktoranckiego w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie w Zakładzie Neurobiologii. W badaniach do pracy doktorskiej wykazałam neuroprotektoryjne efekty antagonistów receptorów mGlu grupy I, agonistów receptorów mGlu grupy III, a także NPY oraz jego pochodnych działających swoiście na receptory Y2 i Y5 w modelach ekscytotoksyczności wywołanej kwasem kainowym *in vitro* i *in vivo*. Badania te były realizowane w ramach działalności statutowej oraz grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji nr 2P05A 114 28 (2005-2008) pt.: „Badania neuroprotektoryjnego działania wybranych neuropeptydów oraz ligandów glutaminianergicznych receptorów metabotropowych”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Maria Śmiałowska. Eksperymenty w ramach grantu były wykonywane we współpracy z Zakładem Neuroendokrynologii Doświadczalnej oraz Zakładem Farmakologii IF PAN, a także z Pracownią Neurochirurgii Doświadczalnej i Klinicznej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w 2008 w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. W 2009 roku otrzymałam również za nią wyróżnienie w Konkursie im. Aurelii Baczko organizowanym przez Towarzystwo Popierania i Krzewienia Nauk na najwybitniejszą pracę doktorską w dziedzinie medycyny klinicznej niezabiegowej.

Fundatorami tego wyróżnienia była Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej oraz prof. Bronisław Baczek.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 5 pracach oryginalnych – 1 przed uzyskaniem stopnia doktora i 4 po jego otrzymaniu:

- **Domin H**, Kajta M, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of MTEP, a selective mGluR5 antagonists and neuropeptide Y on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. *Pharmacol Rep.* 2006, 58, 846-858.
- Śmiałowska M, **Domin H**, Zięba B, Koźniwska E, Michalik R, Piotrowski P, Kajta M. Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo. *Neuropeptides.* 2009, 43, 235-249.
- **Domin H**, Zięba B, Gołombiowska K, Kowalska M, Dziubina A, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of mGluR5 antagonist MTEP: effects on kainate-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Pharmacol Rep.* 2010, 62, 1051-1061.
- Śmiałowska M, Gołombiowska 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, 379-392.
- **Domin H**, Gołombiowska K, Jantas D, Kamińska K, Zięba B, Śmiałowska M. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo. *Neurotox Res.* 2014, 26, 99-113.

Publikacje (Domin i wsp., 2010, 2014; Śmiałowska i wsp., 2012) powstały również w ramach badań sieci naukowej finansowanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 28/E-32/SN-0053/2007 (**2007-2009**) pt.: „Farmakologiczna i genetyczna protekcja oraz cytoprotekcja w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego” (koordynator sieci IMDiK, Warszawa).

W trakcie studiów doktoranckich byłam również zaangażowana w realizację grantu finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki nr 2P05A 123 30 (**2006-2009**) pt.: „Rola dioksyn i receptorów węglowodorów aromatycznych w apoptozie komórek nerwowych: mechanizmy i strategie ochronne”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Małgorzata Kajta. W tym projekcie uczestniczyłam w badaniach nad neuroprotekcijnymi, w tym zwłaszcza antyapoptocznymi efektami fitoestrogenu, jakim jest genisteina, wobec apoptozy indukowanej kwasem glutaminowym, zarówno w hodowlach pierwotnych komórek hipokampa, kory nowej jak i mózdzku. Określiłmy również potencjalny mechanizm neuroprotekcijnego działania genisteiny. Rezultatem mojego zaangażowania w ten projekt jest współautorstwo w 1 publikacji:

- Kajta M, **Domin H**, Grynkiewicz G, Lason W. Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3beta intracellular signaling pathway. *Neuroscience.* 2007, 145, 592-604.

W ramach prac badawczych dotyczących neuroprotekcji wywołanej estrogenami w ośrodkowym układzie nerwowym („Neuroprotekcja wywołana estrogenami w ośrodkowym

układzie nerwowym: rola estrogenów jako regulatorów procesów zapalnych” – projekt DAAD (Niemiecka Centrala Wymiana Akademickiej) przybywałam w lipcu 2006 roku w Instytucie Neuroanatomii na Uniwersytecie w Aachen w Niemczech u prof. dr Cordiana Beyera, a pobyt miał charakter konsultacyjno-szkoleniowy.

W trakcie studiów doktoranckich brałam również udział w działalności statutowej Zakładu Neurobiologii IF PAN, a badania dotyczyły przeciwlękowych efektów ligandów receptorów mGlu grupy II i III oraz zaangażowania w te efekty NPY oraz przeciwlękowej roli kortykoliberyny (CRF) w korze mózgowej szczura. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w 2 pracach, a jedna z nich (Smiałowska i wsp., 2007) otrzymała nagrodę Dyrektora IF PAN za najlepszą pracę oryginalną opublikowaną w 2007:

- Smiałowska M, Wierońska JM, **Domin H**, Zieba B. The effect of intrahippocampal injection of group II and III metabotropic glutamate receptor agonists on anxiety; the role of neuropeptide Y. *Neuropsychopharmacology*. 2007, 32, 1242-1250.
- Zieba B, Grzegorzewska M, Brański P, **Domin H**, Wierońska JM, Hess G, Smiałowska M. The behavioural and electrophysiological effects of CRF in rat frontal cortex. *Neuropeptides*. 2008, 42, 513-523.

W ramach badań sieci naukowej finansowanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego brałam udział w projekcie nr 26/E-40/SN-0023/2007 (**2006-2008**) pt.: „Poszukiwanie wewnątrzustrojowych punktów uchwytu potencjalnych leków neurotropowych” w zespole koordynowanym przez prof. dr. hab. Władysława Lasonia. Badania te dotyczyły określenia potencjału ochronnego calcitriolu (aktywnej formy witaminy D3) podawanej po czynniku uszkadzającym w modelach *in vitro* i *in vivo* (współpraca z Zakładem Neurochemii, IMDiK PAN, Warszawa). Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na konferencji Society for Neuroscience (Waszyngton, 2008), na którą w drodze konkursu otrzymałam stypendium konferencyjne z funduszy sieciowych oraz opisane w 1 publikacji:

- **Domin H**, Lasoń W, Pilc A, Smiałowska M, Kajta M.: Neuroprotective Potential of Post-Treatment with 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3: Effects on Glutamate-Induced Apoptosis in Mouse Hippocampal Neurons. Neuroscience 2008, Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, Waszyngton, USA, 15-19 listopada 2008.
- Kajta M, Makarewicz D, Ziemińska E, Jantas D, **Domin H**, Lasoń W, Kutner A, Łazarewicz JW. Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult in vivo and in vitro. *Neurochem Int*. 2009, 55, 265-274.

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji oryginalnych: **4**

Sumaryczny *impact factor*: **13.089**

Łączna liczba punktów MNiSW: **69**

5.2. Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora brałam udział w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N401 091037 (2009-2012) pt.: „Badania neuroprotektynnego działania pochodnych neuropeptydu Y, pobudzających receptory Y2 i Y5 oraz agonistów receptorów glutaminianergicznym metabotropowych grupy III, w eksperymentalnej ischemii in vitro i in vivo”, którego kierownikiem była prof. dr. hab. Maria Śmiałowska. Projekt był realizowany we współpracy z prof. dr hab. Ewą Koźniewską z Pracowni Neurochirurgii Doświadczalnej i Klinicznej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie oraz z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Rezultaty powstałe w wyniku realizacji tego projektu stanowią część osiągnięcia naukowego opisanego w punktach 4.3.2.2. oraz 4.3.3.2. niniejszego autoreferatu. Część wyników powstałych w wyniku realizacji tego grantu będą włączone do pracy doktorskiej mgr biologii Łukasza Przykazy (IMDiK, Warszawa), nad którym sprawuję funkcję promotora pomocniczego w otwartym przewodzie doktorskim. Badania dotyczące neuroprotektynnych efektów NPY oraz jego pochodnych, pobudzających receptory Y2 i Y5 zostały również opisane w 1 rozdziale w książce w wydawnictwie o zasięgu międzynarodowym z moim współautorstwem:

- Śmiałowska M., **Domin H.** Neuroprotective Effects of Neuropeptide Y and Y2 and Y5 Receptor Agonists In Vitro and In Vivo, In: *Neurodegeneration*. L. Miguel Martins and Samantha H.Y. Loh (Eds.), ISBN 978-953-51-0502-2, IntechOpen, Rijeka, Croatia, 2012, 37-58.

W 2012 roku po otrzymaniu stypendium naukowego dla młodych doktorów (postdoc) w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (PO KL) współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” (MOL-MED)* odbyłam staż podoktorski w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Podczas stażu realizowałam projekt badawczy nr POKL.04.01.01-00-056/10 pt.: „Poszukiwanie zmodyfikowanych analogów neuropeptydu Y działających na receptor Y2 jako potencjalnych związków neuroprotektynnych”, w którym pełniłam funkcję kierownika. Opiekunem stażu była prof. dr hab. Edyta Proniewicz. Badania prowadzone były w obszarze poznania mechanizmu oddziaływania receptor-ligand oraz określenia wpływu modyfikacji łańcucha peptydowego liganda na jego powinowactwo do receptora Y2. Modelowanie przeprowadzono przy wykorzystaniu powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS) dla NPY i jego analogów o agonistycznym działaniu w stosunku do receptora Y2, takich jak NPY 3-36, NPY 13-36, NPY 22-36, Acetyl-

(Leu^{28,31})-NPY 24-36, zaadsorbowanych na granicy faz ciało stałe/roztwór. Jako SERS-aktywnych substratów (biosensorów) użyto powierzchni srebra, złota i miedzi, przygotowanych w warunkach kontrolowanych w postaci nanocząstek metalu i elektrochemicznie schropowaconych powierzchni elektrod. Ponadto wykonano pomiary przy użyciu spektroskopii ramanowskiej (RS) dla peptydów niezaadsorbowanych. W oparciu o tzw. „powierzchniowe reguły wyboru” oraz analizując różnice pomiędzy widmami RS i SERS (szerokości połówkowe pasm, ich położenie oraz relatywne intensywności) zostały wyciągnięte wnioski na temat geometrii adsorpcyjnej badanych peptydów na powierzchni zastosowanych substratów i zmian jakie zachodzą w tej geometrii pod wpływem modyfikacji/skracania łańcucha peptydowego NPY. Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowany został mechanizm adsorpcji NPY oraz jego analogów na odpowiednio przygotowanych substratach srebra, złota i miedzi. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w 3 publikacjach:

- **Domin H**, Pięta E, Piergies N, Święch D, Kim Y, Proniewicz LM, Proniewicz E. Neuropeptide Y and its C-terminal fragments acting on Y2 receptor: Raman and SERS spectroscopy studies. *J Colloid Interface Sci.* 2015, 437, 111-118.
- **Domin H**, Święch D, Piergies N, Pięta E, Kim Y, Proniewicz E. Characterization of the surface geometry of acetyl-[Leu(28,31)]-NPY(24-36), a selective Y-2 receptor agonist, onto the Ag and Au surfaces. *Vib. Spectrosc.* 2016, 85, 1-6.
- **Domin H**, Piergies N, Święch D, Pięta E, Proniewicz E. SERS characterization of neuropeptide Y and its C-terminal fragments deposited onto colloidal gold nanoparticle surface. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017, 149, 80-88.

Współpraca nawiązana podczas stażu podoktorskiego kontynuowana jest do dnia dzisiejszego przez realizację z:

- Akademią Górniczo-Hutniczą im. Stanisława Staszica w Krakowie wspólnego grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w konkursie Opus 11 (Konsorcjum) (2017-2020) (nr 2016/21/B/ST4/02135) pt.: „Badania adsorpcji związków biologicznie czynnych na granicy faz metal/roztwór i tlenek metalu/roztwór przy wykorzystaniu technik SERS, TERS i SEIRA”, kierowanego przez prof. dr hab. Edytę Proniewicz. Liderem projektu była Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Partnerem nr I Uniwersytet Gdański, Partnerem nr II Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie. W tym projekcie byłam kierownikiem zadania naukowego realizowanego przez Partnera II. Celem wykonywanych prac była ewaluacja aktywności biologicznej nowo zsyntetyzowanych analogów peptydów dla receptorów bradykininy (BK1R, BK2R), bombezyny (BB1, BB2) i neurotensyny (NTR1, NTR2) pod kątem czy nowo zsyntetyzowany związek wykazuje działanie agonistyczne czy antagonistyczne do danego typu receptora. Jako że bradykinina,

bombezyna oraz neurotensyna uczestniczą w stymulacji wzrostu i ekspansji komórek nowotworowych, w projekcie poszukiwane były związki o właściwościach antagonisty powyższych receptorów a więc potencjalnie związki o działaniu przeciwnowotworowym. Związki o właściwościach antagonisty przebadano pod kątem ich wpływu na komórki linii nowotworowych: H4 (glejak), U-87 MG (glejak/gwiaździak), SHP-77 (nowotwór drobnokomórkowy płuc), a także określono ich potencjalny mechanizm przeciwnowotworowego działania.

- Instytutem Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie (współpraca nieformalna) badań w zakresie procesu adsorpcji ligandów receptorów Y na różnorodnych powierzchniach metalicznych przy wykorzystaniu technik spektroskopii oscylacyjnej. Część wyników z przeprowadzonych badań została opublikowana w pracy włączonej do głównego osiągnięcia naukowego (**Domin i wsp., 2019**), opisanego w punkcie 4.3.4.2. niniejszego autoreferatu. Ponadto w wyniku tej współpracy powstały kolejne publikacje z moim udziałem:

- Pięta E, Piergies N, Oćwieja M, **Domin H**, Paluszkiewicz C, Bielańska E, Kwiatek WM. Monitoring the Interfacial Behavior of Selective Y5 Receptor Antagonist on Colloidal Gold Nanoparticle Surfaces: Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy Studies. *J. Phys. Chem. C*, 2017, 121, 17276–17288.
- Piergies N, Pięta E, Paluszkiewicz C, **Domin H**, Kwiatek WM. Polarization effect in tip-enhanced infrared nanospectroscopy studies of the selective Y5 receptor antagonist Lu AA33810. *Nano Research*. 2018, 11, 4401-4411.

Kolejnym projektem badawczym, w którym brałam udział był grant DeMeTer (Depresja-Mechanizmy-Terapia) (nr POIG.01.01.02-12-004/09-00) (**2010-2014**) współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, którego kierownikiem był prof. dr hab. Krzysztof Wędzony. W ramach tego grantu uczestniczyłam w zadaniu badawczym, pt.: „Badania anatomiczne i funkcjonalne nad rolą zaburzeń równowagi układów GABA/Glu w strukturach limbicznych w patogenezie i farmakoterapii zaburzeń depresyjnych, z uwzględnieniem roli komórek glejowych”, które kierowane było przez prof. dr hab. Marię Śmiałowską. W tym projekcie uczestniczyłam jako planujący, wykonujący i koordynujący eksperymenty, a celem prac było zbadanie potencjalnych przeciwdepresyjnych własności ligandów receptorów mGlu oraz ligandów receptorów Y2 i Y5 u zwierząt naiwnych oraz w eksperymentalnym modelu depresji opartym na uszkodzeniach funkcji gleju. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych wchodzących w skład głównego osiągnięcia naukowego opisanego w punkcie 4.3.4.2. niniejszego autoreferatu, a także w 2 innych publikacjach (1 praca przeglądowa oraz 1 oryginalna):

- Śmiałowska M, Szewczyk B, Woźniak M, Wawrzak-Wleciał A, **Domin H**. Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol Rep.* 2013, 65, 1572-1579. Review.
- **Domin H**, Szewczyk B, Woźniak M, Wawrzak-Wleciał A, Śmiałowska M. Antidepressant-like effect of the mGluR5 antagonist MTEP in an astroglial degeneration model of depression. *Behav Brain Res.* 2014, 273, 23-33.

W ramach realizacji tego projektu oraz działalności statutowej nawiązałam **współpracę nieformalną** z prof. dr hab. Elżbietą Wyską z Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJ Collegium Medicum w Krakowie oraz z prof. dr hab. Piotrem Właziem z Katedry Fizjologii Zwierząt i Farmakologii, Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w zakresie badania farmakokinetyki związków. Rezultatem tej współpracy są wyniki badań włączone do głównego osiągnięcia naukowego opisanego w punkcie 4.3.4.2. niniejszego autoreferatu.

W okresie po osiągnięciu stopnia doktora byłam również zaangażowana jako wykonawca w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N401 006635 (2008-2011) pt.: „Modulowanie przekąźnictwa z udziałem tlenu w strukturach jąder podstawy jako potencjalny cel terapii choroby Parkinsona. Badania w modelu zwierzęcym”, którego kierownikiem była dr hab. Elżbieta Lorenc-Koci z Zakładu Neuropsychofarmakologii IF PAN. Projekt ten dotyczył określenia roli przekąźnictwa z udziałem tlenu azotu (przekąźnictwo nitrergiczne) w jądrach podstawy w szczurzym modelu choroby Parkinsona wywołanym jednostronnym podaniem 6-hydroksydopaminy (6-OHDA). W projekcie tym brałam udział w barwieniach histologicznych i immunohistochemicznych skrawków mózgu oraz w stereologicznej analizie komórkowej w obrazach mikroskopowych. Rezultatem mojego zaangażowania w ten projekt jest współautorstwo w 1 publikacji:

- Czarna A, Lenda T, **Domin H**, Konieczny J, Śmiałowska M, Lorenc-Koci E. Alterations in the expression of nNOS in the substantia nigra and subthalamic nucleus of 6-OHDA-lesioned rats: the effects of chronic treatment with l-DOPA and the nitric oxide donor, molsidomine. *Brain Res.* 2013, 1541, 92-105.

Oprócz tego w ramach współpracy z Zakładem Neuropsychofarmakologii IF PAN brałam udział w badaniach sieciowych pt.: „Poszukiwanie wewnątrzustrojowych punktów uchwytu potencjalnych leków neurotropowych”, o których pisałam powyżej. Druga część tych badań dotyczyła poszukiwania związków ochronnych do przeciwdziałania uszkodzeniom komórek nerwowych wywołanym zahamowaniem funkcji proteasomu w komórkowym i zwierzęcym modelu choroby Parkinsona. Moja rola w tym zadaniu polegała na wykonaniu barwień histologicznych i immunohistochemicznych oraz na stereologicznej analizie komórkowej w obrazach mikroskopowych. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

- Lorenc-Koci E, Lenda T, Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, **Domin H**, Śmiałowska M, Konieczny J. Different effects of intranigral and intrastriatal administration of the proteasome inhibitor lactacystin on typical neurochemical and histological markers of Parkinson's disease in rats. *Neurochem Int.* 2011, 58, 839-849.
- Konieczny J, Jantas D, Lenda T, **Domin H**, Czarnecka A, Kuter K, Śmiałowska M, Lasoń W, Lorenc-Koci E. Lack of neuroprotective effect of celastrol under conditions of proteasome inhibition by lactacystin in in vitro and in vivo studies: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2014, 26, 255-273.

W ramach współpracy z Zakładem Neuropsychofarmakologii IF PAN przeprowadzałam również badania immunohistochemiczne uwidaczniające zarówno neurony dopaminowe jak i serotoninowe oraz brałam udział w stereologicznej analizie ilościowej tych immunoreaktywnych neuronów w obrębie serotoninowego jądra grzbietowego szwu (DR) w skrawkach mózgu szczura w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona z objawami depresji. Nowością tych badań była ocena ilościowa występowania neuronów dopaminowych w typowo serotoninowym DR, projektującym do prążkowiec i kory mózgowej. Rezultatem mojego zaangażowania w te badania jest współautorstwo w 1 publikacji:

- Berghauzen-Maciejewska K, Wardas J, Kosmowska B, **Domin H**, Śmiałowska M, Głowacka U, Ossowska K. Adaptive down-regulation of the serotonin transporter in the 6-hydroxydopamine-induced rat model of preclinical stages of Parkinson's disease and after chronic pramipexole treatment. *Neuroscience.* 2016, 314, 22-34.

W Zakładzie Neurobiologii IF PAN byłam również zaangażowana w dwa granty kierowane przez prof. dr hab. Andrzeja Pilca. Pierwszy to by grant polsko-norweski nr PNRF-103-AI-1/07 (**2009-2011**) pt.: „Stworzenie platformy do poszukiwania związków działających na układy serotonergiczny lub glutamatergiczny jako potencjalnych leków przeciwdepresyjnych lub przeciwlękowych” (realizowany wspólnie z Zakładem Biologii Medycznej Uniwersytetu w Tromsø, Norwegia, oraz z Zakładem Biologii Komórki Narodowego Instytutu Leków, Warszawa). Celem badań było sprawdzenie potencjalnej aktywności przeciwlękowej nowych ligandów receptorów serotonergicznym 5-HT₇ oraz ligandów receptorów mGlu, a mój udział w tym projekcie polegał na przygotowywaniu związków do eksperymentów i pomocy w doświadczeniach behawioralnych. Drugi projekt realizowany był w ramach Programu Badań Stosowanych Allosterix, finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr PBS1/B7/8/2012) (**2012-2017**) pt. „Innowacyjne terapie chorób neurodegeneracyjnych i neurorozwojowych w oparciu o modulatory allosteryczne receptorów mGlu”. W tym projekcie wykonywałam perfuzje myszy w celu przygotowania tkanki mózgowej do badań farmakokinetycznych.

W Zakładzie Neurobiologii IF PAN w ramach współpracy z Pracownią Neurobiologii Pierwiastków Śladowych byłam zaangażowana w badania dotyczące molekularnych

mechanizmów leżących u podłoża przeciwdepresyjnej aktywności cynku, a moja rola w tych badaniach polegała na wykonywaniu operacji stereotaktycznych u szczurów w celu zaimplantowania kaniul prowadzących do podań domózgowych (dokomorowych). Ponadto byłam zaangażowana w projekt finansowany przez NCN w konkursie Opus 10 (2016-2021) (nr 2015/19/B/NZ4/01890) pt.: „Rola wybranych szlaków przekazywania sygnału w deficycie cynku”, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Gabriel Nowak. Celem tego projektu jest określenie zależności pomiędzy deficytem cynku (ZnD) jako zwierzęcym modelem depresji, a aktywnością wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału, które są zaangażowane w procesy synaptogenezy i przeżywalności komórek. W tym projekcie uczestniczyłam w barwieniu kolców dendrytycznych metodą Golgiego oraz wykonałam ilościową analizę kolców dendrytycznych w korze przedczołowej przyśrodkowej myszy w obrazach mikroskopowych. Rezultatem mojego zaangażowania w te badania jest współautorstwo w 3 publikacjach:

- Szewczyk B, Pochwat B, Rafała A, Palucha-Poniewiera A, **Domin H**, Nowak G. Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc. *Neuropharmacology*. 2015, 99, 517-526.
- Pochwat B, Rafała-Ulińska A, **Domin H**, Misztak P, Nowak G, Szewczyk B. Involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the short and long-lasting antidepressant-like activity of NMDA receptor antagonists (zinc and Ro 25-6981) in the forced swim test in rats. *Neuropharmacology* 2017, 125, 333-342.
- Pochwat B, **Domin H**, Rafała-Ulińska A, Szewczyk B, Nowak G. Ketamine and Ro 25-6981 Reverse Behavioral Abnormalities in Rats Subjected to Dietary Zinc Restriction. *Int J Mol Sci*. 2020, 21, 4791.

W Zakładzie Neurobiologii IF PAN brałam również udział w badaniach finansowanych z grantu NCN Opus 9 (nr 2015/17/B/NZ7/02984) pt.: „Jednoczesna stymulacja receptorów muskarynowych M4 oraz wybranych receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu (mGlu2, mGlu4 lub GABAB) jako nowy trend w poszukiwaniu skutecznych punktów uchwytu dla leków antypsychotycznych. Rola poszczególnych kombinacji związków w kontekście odwracania pozytywnych, negatywnych lub kognitywnych objawów schizofrenii”, którego kierownikiem była dr hab. Joanna Wierońska. Moja rola w tych badaniach polegała na wykonaniu barwień immunofluorescencyjnych w celu wykazania kolokalizacji receptorów muskarynowych M1 i M5 z mGluR2 w skrawkach mózgu myszy i szczura oraz analizie uzyskanych obrazów mikroskopowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w następującej publikacji:

- Cieślak P, **Domin H**, Chocyk A, Gruca P, Litwa E, Płoska A, Radulska A, Pelikant-Małecka I, Brański P, Kalinowski L, Wierońska JM. Simultaneous activation of mGlu2 and muscarinic receptors reverses MK-801-induced cognitive decline in rodents. *Neuropharmacology*. 2020, 174, 107866.

W 2018 roku zostałam laureatem konkursu Miniatura 2 NCN, w którym otrzymałam finansowanie na realizację działania naukowego (nr 2018/02/X/NZ4/01109) pt.: „Staż naukowy w zakresie eksperymentalnych technik mikrochirurgicznych”. Staż naukowy odbyłam w dniach 06-17.05.2019 w Centrum Umiejętności Chirurgicznych (Surgical Skills Centre) w Almere w Holandii pod kierunkiem prof. dr René Remie. Staż zakończyłam wynikiem pozytywnym (certyfikat nr 20180509), a efektem zrealizowanego działania naukowego jest zdobycie przeze mnie nowych umiejętności z technik mikrochirurgicznych, takich jak wywoływanie zwierzęcych modeli przejściowego udaru niedokrwienego mózgu przez zaciśnięcie tętnicy środkowej mózgu (tMCAO) oraz urazowego uszkodzenia mózgu (TBI – traumatic brain injury) głównie u szczurów.

Podsumowanie dorobku naukowego po otrzymaniu stopnia doktora:

Liczba publikacji oryginalnych: **26**

Liczba publikacji przeglądowych: **1**

Liczba publikacji książkowych: **1**

Sumaryczny *impact factor*: **99.110**

Łączna liczba punktów MNiSW: **1087**

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę:

- promotor pomocniczy mgr biologii Łukasza Przykazy w otwartym przewodzie doktorskim (otwarcie przewodu doktorskiego na posiedzeniu Rady Naukowej IMDiK w Warszawie w dniu 28 kwietnia 2016);
- opieka naukowa nad praktykami studenckimi (3) (studenci kierunku Neurobiologii UJ oraz Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (lipiec 2019));
- przeprowadzenie warsztatów z technik histologicznych i mikroskopowania w ramach popularyzacji nauki podczas Festiwalu Nauki i Sztuki w dniach 17-18.05.2018 współorganizowanym przez Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie;
- współautorstwo w 2 pracach przeglądowych w języku polskim w czasopiśmie popularyzującym naukę *Wszechświat* (pismo przyrodnicze):

- Śmiałowska M, **Domin H.** Astrocyty a depresja. *Wszechświat*, 2015, 116, nr 10-12, 282-286.
- Śmiałowska M, **Domin H.** Astrocyty a intelekt. *Wszechświat*, 2015, 116, nr 7-9, 204-209.

7. Inne informacje:

- współautor 53 doniesień zjazdowych: 27 na konferencjach krajowych; 26 na konferencjach międzynarodowych; w tym jako pierwszy autor: 1 prezentacja w formie ustnej oraz 20 prezentacji w formie plakatowej;
- wygłoszenie 2 wykładów monograficznych na forum IF PAN (2019, 2020); 13 prezentacji w formie ustnej na zebraniach naukowych w IF PAN (w latach 2005-2017); 1 prezentacja w formie ustnej przed Radą Naukową IF PAN dotycząca grantu Opus 11 (2016/21/B/ST4/02135) (2020);
- członek zwyczajny Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PTBUN);
- członek redakcji (*Review editor*) czasopisma *Frontiers Cellular Neuroscience* w dziale *Cellular Neuropathology*;
- zrecenzowanie 37 manuskryptów (*peer-review*) w 18 czasopismach o zasięgu międzynarodowym [Behavioural Brain Research (1), Biological Chemistry (1), Cellular and Molecular Neurobiology (1), Cellular Physiology and Biochemistry (1), Frontiers in Cellular Neuroscience (1), Frontiers in Pharmacology (1), Journal of Medicinal Chemistry (2), Journal of Neuroendocrinology (1), Journal of Visualized Experiments (1), Molecules (2), Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (1), Neuroscience (1), NeuroMolecular Medicine (1), Neural Regeneration Research (4), Pharmacological Reports (18), Phytomedicine (1), Scientific Reports (1), Synapse (1)] w latach 2013-2021
<https://publons.com/researcher/3877055/helena-domin/peer-review/>
- wykonanie recenzji doktoratu zagranicznego pt.: „Investigation of corticosterone impact on the sub-acute stage of recovery after photothrombotic stroke induction” (Scholl of Biomedical Sciences and Pharmacy, Faculty of Health and Medicine, University of Newcastle Australia) (lipiec 2018)
- 3 stypendia konferencyjne w latach 2008-2017; nagroda Dyrektora IF PAN za najlepszą pracę oryginalną opublikowaną w 2007; nagrody IF PAN w programie „Quantitas” i Qualitas” za prace naukowe opublikowane w latach 2013-2016
- **naukometryczne podsumowanie dorobku naukowego:**
 - ✓ Liczba publikacji oryginalnych: **30**
 - ✓ Liczba publikacji przeglądowych: **1**
 - ✓ Liczba publikacji książkowych: **1**
 - ✓ Liczba publikacji popularno-naukowych: **2**

Sumaryczny Impact Factor publikacji naukowych według bazy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **IF = 112.199**, co stanowi **1156 punktów MNiSW/KBN**.

Łączna liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science z dnia 12.01.2021 r.:

- liczba cytowań z autocytowaniami: **507**
- liczba cytowań bez autocytowań: **453**

Indeks Hirsha według bazy Web of Science z dnia 12.01.2021 r.:

H-indeks = 14

18.01.2021r.

Helena Domin