



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

**AUTOREFERAT**

**DR AGNIESZKA WNUK**

**PRACOWNIA NEUROFARMAKOLOGII I EPIGENETYKI  
ZAKŁAD FARMAKOLOGII  
INSTYTUT FARMAKOLOGII IM. JERZEGO MAJA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Kraków, 2023 r.**

1. Imię i nazwisko

**AGNIESZKA WNUK**

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

**11 grudnia 2018** - uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych z wyróżnieniem, w dyscyplinie biologia medyczna; stopień nadany przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

- ✓ tytuł pracy doktorskiej „*The effects of the chemical UV filter - benzophenone-3 in the mouse neuronal cells*”, wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Małgorzaty Kajta

**2012 - 2013** – studia podyplomowe z wyróżnieniem – specjalizacja: **biologia molekularna**; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**2010 - 2012** – uzyskanie tytułu magistra biologii z wyróżnieniem, specjalizacja **genetyka i biologia rozrodu**

- ✓ tytuł pracy magisterskiej „*Analiza ekspresji genów mOvo1 i mOvo2 u myszy z wodomaciczem i niedrożnością pochwy*”; Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków; promotor: dr Małgorzata Lenartowicz

**2007 - 2010** – uzyskanie tytułu licencjata biologii z wyróżnieniem

- ✓ tytuł pracy licencjackiej „*Zastosowanie modeli zwierzęcych w badaniach nad chorobą Wilsona*”; Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków; promotor: dr Małgorzata Lenartowicz

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

Miejsce zatrudnienia:

#### **Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**

- ❖ **wrzesień 2020 – obecnie** - stanowisko: **ADIUNKT** - Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki, Zakład Farmakologii
- ❖ **grudzień 2018 – sierpień 2020** – stanowisko: **ASYSTENT** - Pracownia Neuroendokrynologii Molekularnej, Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
- ❖ **październik 2017 - listopad 2018** – stanowisko: **PRACOWNIK INŻYNIERYJNO-TECHNICZNY** - Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
- ❖ **październik 2013 - wrzesień 2017** – stanowisko: **DOKTORANT** - Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
- ❖ **grudzień 2012 – wrzesień 2013** – stanowisko: **PRACOWNIK INŻYNIERYJNO-TECHNICZNY** - Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
- ❖ **wrzesień - grudzień 2012** – stanowisko: **STAŻYSTA** - Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

**Cykl artykułów wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego, na które składa się 5 prac oryginalnych i 1 praca przeglądowa.**

1. **WNUK A**, Rzemieniec J, Przepiórska K, Wesołowska J, Wójtowicz AK, Kajta M. *Autophagy-related neurotoxicity is mediated via AHR and CAR in mouse neurons exposed to DDE*. *Sci Total Environ*. 2020 Nov 10;742:140599. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140599.  
IF<sub>2020</sub> – 7.963, MNiSW - 200; cytacje – 7
2. **WNUK A**, Przepiórska K, Rzemieniec J, Pietrzak B, Kajta M. *Selective Targeting of Non-nuclear Estrogen Receptors with PaPE-1 as a New Treatment Strategy for Alzheimer's Disease*. *Neurotox Res*. 2020 Dec;38(4):957-966. doi: 10.1007/s12640-020-00289-8.  
IF<sub>2020</sub> – 3.911, MNiSW – 70; cytacje – 6
3. **WNUK A**, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia*. *Biomedicines*. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.  
IF<sub>2021</sub> – 4.757, MNiSW - 100; cytacje – 5
4. **WNUK A**, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Posttreatment Strategy Against Hypoxia and Ischemia Based on Selective Targeting of Nonnuclear Estrogen Receptors with PaPE-1*. *Neurotox Res*. 2021 Dec;39(6):2029-2041. doi: 10.1007/s12640-021-00441-y.  
IF<sub>2021</sub> – 3.978, MNiSW - 70; cytacje – 2
5. **WNUK A**, Rzemieniec J, Przepiórska K, Pietrzak BA, Maćkowiak M, Kajta M. *Prenatal Exposure to Triclocarban Impairs ESRI Signaling and Disrupts Epigenetic Status in Sex-Specific Ways as Well as Dysregulates the Expression of Neurogenesis- and Neurotransmitter-Related Genes in the Postnatal Mouse Brain*. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 4;22(23):13121. doi: 10.3390/ijms222313121.  
IF<sub>2021</sub> – 6.208, MNiSW - 140; cytacje – 0
6. **WNUK A**, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Emerging evidence on membrane estrogen receptors as novel therapeutic targets for central nervous system pathologies*. Praca przeglądowa. *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24(4), 4043; <https://doi.org/10.3390/ijms24044043>  
IF<sub>2021</sub> – 6.208, MNiSW - 140; cytacje – 0

**Sumaryczny Impact Factor – 33.025; sumaryczne punkty MNiSW – 720**

Tytuł osiągnięcia:

**IDENTYFIKACJA SZLAKÓW MOLEKULARNYCH ANGAŻUJĄCYCH  
RECEPTORY ESTROGENOWE ORAZ RECEPTORY DLA KSENOBIOTYKÓW  
W NEUROPROTEKCJĘ I NEUROTOKSYCZNOŚĆ.**

**Receptory estrogenowe i receptory dla ksenobiotyków w układzie nerwowym**

Estrogeny to ogólny termin odnoszący się do hormonów steroidowych, takich jak estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) i estretrol (E4). Wśród nich najsilniejszym i najbardziej rozpowszechnionym jest estradiol (17 $\beta$ -estradiol, E2). Dodatkowo istnieją pewne związki egzogenne, o właściwościach zbliżonych do estrogenów, takie jak fitoestrogeny pochodzenia naturalnego (np. genisteina, daidzeina) oraz syntetyczne ksenoestrogeny (np. bisfenol A, benzofenon-3, triklokarban, DDT i jego metabolit DDE), które mogą zaburzać hormonalną odpowiedź komórkową. W biologicznym działaniu estrogenów pośredniczą dwa podtypy receptorów estrogenowych (ER) – jądrowe (klasyczne) i błonowe (niejądrowe, nieklasyczne, pozajądrowe). Do jądrowych receptorów estrogenowych należą ER $\alpha$ /ESR1 i ER $\beta$ /ESR2, które działają jako czynniki transkrypcyjne regulując zdecydowaną większość efektów hormonalnych w tkankach obwodowych. Z kolei niejądrowe receptory estrogenowe (mER), do których należą zakotwiczone w błonie komórkowej klasyczne receptory ER $\alpha$  (mER $\alpha$ ) i ER $\beta$  (mER $\beta$ ) oraz receptory związane z białkami G, w tym receptory GPER1 (GPR30), ER-X i Gq-mER działają za pośrednictwem wtórnych przekaźników, w wyniku czego regulują szybką odpowiedź na działanie estrogenów, głównie w układach sercowo-naczyniowym, metabolicznym i nerwowym.

Powszechnie przyjmuje się, że sygnalizacja za pośrednictwem receptorów estrogenowych odgrywa kluczową rolę w neurogenezie, neurorozwoju, neuroprotekcji, a jej upośledzenie może predysponować do chorób neurodegeneracyjnych i deficytów rozwojowych (Bustamante-Barrientos i wsp. 2021). Jednak zastosowanie terapii polegającej na aktywacji receptorów estrogenowych przez estrogeny może prowadzić do poważnych skutków ubocznych, w tym zaburzeń zakrzepowo-zatorowych i zwiększonego ryzyka zachorowania na nowotwory piersi i macicy. W ostatnich latach zauważono, że w odróżnieniu od jądrowych ER wywołujących efekty hormonalne, mER mogą stać się idealnymi celami farmakologicznymi, a ich aktywacja będzie pozbawiona negatywnych skutków ubocznych związanych z transkrypcyjną aktywnością jądrowych ER.

W mózgu, mER są zlokalizowane głównie w korze przedczołowej, grzbietowej części prążkowiec, jądrze półleżącym i w hipokampie, gdzie odpowiadają za szybkie efekty działania estrogenów m.in. są zaangażowane w procesy uczenia się i pamięci (Liu i wsp. 2013, Zou i wsp. 2015). Wykazano, że mER $\alpha$  i mER $\beta$  licznie występują na kolcach dendrytycznych, a aktywacja Src, ERK1/2 i postsynaptycznego TrkB za pośrednictwem mER $\alpha$  uczestniczy w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym – LTP. Proces ten stanowi podstawę tworzenia pamięci i uczenia się, jednak efekt działania receptorów estrogenowych widoczny był jedynie u samic (Mitterling i wsp., 2010, Wang i wsp. 2018). Błonowe receptory estrogenowe są również licznie zlokalizowane w tratwach lipidowych – sygnalosomach, gdzie przekazują odpowiedź komórkową poprzez białko kotwiczące do tratwy - kaweolinę-1 skompleksowaną z kolejnymi, wtórnymi przekazywaczami. Coraz częściej sugeruje się, że nieprawidłowe działanie kompleksów mER – sygnalosom może wywołać patologię w postaci choroby Alzheimera (Canerina-Amaro i wsp. 2017). Co więcej, zaobserwowano, że sygnalizacja zależna od mER $\alpha$ 36 (izofорма mER $\alpha$ ) jest zaangażowana w neuroprotekcję, poprzez aktywację szlaku ERK, zahamowanie translokacji białka związanego z domeną śmierci (Daxx) oraz inaktywację kanału anionowego regulowanego przez zmianę potencjału - VDAC (Martin i wsp. 2007, Lan i wsp. 2015, Mahboobifard i wsp. 2020). Ponadto, ekscytotoksyczność wywołana nadmierną aktywacją receptorów glutaminianergicznym może być wyciszana przez stymulację mER; wykazano ten proces w zwierzęcym modelu udaru, gdzie niska dawka tamoksifenu aktywuje receptory mER $\alpha$ 36 (Bano i Nicotera, 2007, Zou i wsp. 2015).

W odniesieniu do neuroprotekcji nie sposób nie wspomnieć o dotychczas najlepiej poznanym błonowym ER, czyli GPER1. Niemniej jednak stymulacja GPER1 w układzie nerwowym budzi wiele kontrowersji zwłaszcza w kontekście nowotworzenia i nasilenia skutków udarów mózgu. Z jednej strony selektywna aktywacja GPER1 względnie GPER1 i Gq-mER za pomocą agonistów - G1 czy STX chroni neurony i astrocyty przed ekscytotoksycznością oraz toksycznością wywołaną  $\beta$ -amyloidem (Lebesgue i wsp. 2010, Gray i wsp. 2016, Yue i wsp. 2019, Wang i wsp. 2020). Z drugiej zaś strony w pierwotnych hodowlach neuronalno-glejowych narażonych na warunki OGD (pozbawienie tlenu i glukozy, z ang. oxygen and glucose deprivation), selektywna aktywacja GPER1 promuje śmierć astrocytów poprzez silny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia za pośrednictwem PLC (Roque i wsp., 2019). Co więcej, najnowsze dane wskazują, że specyficzna aktywacja GPER1 przez G1 w sposób dawkozależny zmniejsza proliferację macierzystych komórek nerwowych / komórek progenitorowych (Zhong i wsp. 2019). Z tego powodu wysoce selektywna aktywacja

poszczególnych mER (z wyłączeniem GPER1) wydaje się być kluczowym kierunkiem poszukiwań skutecznej terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego, co zostało [szczegółowo omówione w pracy przeglądowej nr 6](#).

Podobnie jak receptory estrogenowe, istotnym elementem ochrony komórek nerwowych jest receptor aktywowany przez proliferatory peroksosomów typu gamma - PPAR $\gamma$ . Wprawdzie jest on zaliczany do tzw. receptorów dla ksenobiotyków, ale w odróżnieniu od większości z nich, ksenobiotyki hamują aktywność PPAR $\gamma$ , co wiąże się z utratą jego właściwości neuroprotekcyjnych. Co więcej, PPAR $\gamma$  w niektórych tkankach przejmuje funkcję receptora estrogenowego ER $\alpha$  (Bonofiglio i wsp. 2005, Chu i wsp. 2014, Rzemieniec i wsp., 2018).

Receptor PPAR $\gamma$  jest obecny w większości typów komórek ośrodkowego układu nerwowego, w tym w neuronach, astrocytach i mikrogleju, gdzie jest silnie zaangażowany w odpowiedź na stres oksydacyjny i prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów (Warden i wsp., 2016, Villapol 2018, Prashantha Kumar i wsp., 2020). Główną funkcją receptora PPAR $\gamma$  jest regulowanie komórkowej wrażliwości na insulinę oraz metabolizmu glukozy i lipidów. Poza tym receptor PPAR $\gamma$  wpływa na proliferację i różnicowanie komórek, wytwarzanie czynników troficznych, jak też na modulowanie stanu zapalnego i komórkowej równowagi redoks (Marion-Letellier i wsp., 2016; Cai i wsp., 2018). Poza układem nerwowym, receptor PPAR $\gamma$  występuje głównie w tkance tłuszczowej, jelicie grubym i komórkach krwiotwórczych (Marion-Letellier i wsp., 2016). Receptor PPAR $\gamma$  należy do nadrodziny receptorów jądrowych. W momencie aktywacji przez naturalny lub syntetyczny ligand, tworzy heterodimer z receptorem retinoidowym typu X (RXR) i rekrutuje koaktywatory. Następnie kompleks wiąże się z promotorem genu zawierającym element odpowiedzi proliferatora peroksosomów (PPRE) i w ten sposób reguluje transkrypcję określonych genów (Culman i wsp., 2007).

W odróżnieniu od receptorów ER i PPAR $\gamma$ , które są zaangażowane głównie w neuroprotekcję, receptory dla ksenobiotyków, takie jak receptor węglowodorów aromatycznych (z ang. *aryl hydrocarbon receptor*, AHR) i konstytutywny receptor androstanu (z ang. *constitutive androstan receptor*, CAR) uczestniczą w wywołanej ksenobiotykami neurotoksyczności. Mimo iż początkowo wymienione receptory wiązano przede wszystkim z odpowiedzią komórkową na ksenobiotyki, niedawno udowodniono istotny wpływ tych receptorów na proliferację, migrację i różnicowanie komórek nerwowych, a także w kształtowanie się bariery krew-mózg (Lemmen i wsp. 2013, Kimura i wsp. 2016, Oliviero i wsp. 2020).

Nie od dziś wiadomo, że ekspozycja na ksenobiotyki może doprowadzić do trwałych zaburzeń układu nerwowego, szczególnie jeśli narażenie na nie ma miejsce podczas rozwoju prenatalnego lub wczesnopoostnatalnego. Obserwowany w ostatnim czasie znaczny wzrost liczby przypadków autyzmu, zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) oraz agresji zwrócił uwagę naukowców i klinicystów na możliwy wpływ ksenobiotyków, w tym substancji endokrynnie czynnych (substancji zaburzających funkcje endokrynne, z ang. *endocrine disrupting chemicals*, EDCs) na etiologię chorób neurozwojowych. Obecnie podnosi się także znaczenie związków z grupy EDCs w etiologii chorób dorosłego układu nerwowego, w tym choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, udaru mózgu czy depresji.

### **Etiologia i potencjalne szlaki terapeutyczne w leczeniu niedokrwiennego udaru mózgu, niedotlenienia okołoporodowego i choroby Alzheimera**

Udar mózgu jest drugą co do częstości przyczyną zgonów i główną przyczyną niepełnosprawności na świecie (WHO, Global Health Observatory Data). Około 3/4 wszystkich udarów występuje u osób w wieku  $\geq 65$  lat, ale przypadłość ta dotyczy osób w każdym wieku (Yousufuddin i Young, 2019). Istnieją 3 główne rodzaje udaru mózgu: udar niedokrwienny, udar krwotoczny i przemijający atak niedokrwienny. Udar niedokrwienny stanowi aż 87% wszystkich przypadków udaru mózgu (Centra Kontroli i Prewencji Chorób - CDC, 2020). Obecnie wysoka śmiertelność po udarze mózgu spowodowana jest brakiem skutecznej farmakoterapii o szerokim oknie terapeutycznym oddziałującej na złożone procesy towarzyszące niedokrwieniu i reperfuzji. Jedyną terapią farmakologiczną zatwierdzoną przez Agencję Żywności i Leków (FDA) w przypadku ostrego udaru niedokrwiennego mózgu jest rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rt-PA). Niemniej jednak terapia z użyciem rt-PA jest skuteczna tylko wtedy, gdy zostanie podana do 4,5 godziny od wystąpienia niedokrwienia i ma szereg przeciwwskazań oraz skutków niepożądanych, takich jak ekscytotoksyczność, krwotok i obrzęk mózgu (Jilani i Siddiqui, 2022). Ze względu na liczne ograniczenia, tylko 5% pacjentów może być poddanych leczeniu z wykorzystaniem rt-PA (Miller i wsp. 2011, Frenzl i Csiba, 2011). Chirurgiczna trombektomia (mechaniczne usunięcie skrzepliny poudarowej) wspomaga leczenie udaru wewnątrznaczyniowego, jednak nie więcej niż 2% pacjentów kwalifikuje się do tej procedury, ze względu na ograniczenie czasowe do 6-8 godzin od wystąpienia pierwszych objawów (Słowik, 2014).



Niedotlenienie okołoporodowe (inaczej asfiksja okołoporodowa) jest najczęstszą przyczyną śmierci płodów i noworodków. Co roku, 1 milion dzieci umiera z powodu niedotlenienia, a około 25% tych, które przeżyły asfiksję, wykazuje trwałe deficyty neurologiczne (Manandhar i Basnet, 2019). Przyczyną niedotlenienia okołoporodowego jest, jak sama nazwa wskazuje, niedobór tlenu w trakcie trwania ciąży lub podczas akcji porodowej. Złotym standardem leczenia asfiksji noworodków jest tlenoterapia połączona z umiarkowaną hipotermią, ale te działania należy podjąć do 6 godzin od wystąpienia niedotlenienia (Frajewicki i wsp. 2020). Ponadto, przeciwwskazaniem w zastosowaniu powyższego leczenia jest waga dziecka poniżej 1800 gramów oraz wiek poniżej 36 tygodni (Sakr i Balasundaram, 2022). Co więcej, dostępność do tej terapii jest mocno ograniczona, ponieważ w Polsce jedynie 28 ośrodków medycznych jest wyposażonych w dedykowane tym procedurom urządzenia. W świetle stosowanej terapii, niepokojące są ostatnie dane wskazujące, że umiarkowana hipotermia terapeutyczna może zwiększać ryzyko przetrwałego nadciśnienia płucnego u noworodków (Vijverberg i wsp. 2021). Udowodniono także, że jeśli podczas niedotlenienia okołoporodowego współwystępuje stan zapalny, to hipotermia zaostrza stan zapalny, co prowadzi do aktywacji ścieżek apoptozy i nekrozy znacząco pogarszając stan dziecka (Danlandi i wsp. 2021). Biorąc pod uwagę, że czas od wystąpienia udaru mózgu czy niedotlenienia okołoporodowego jest kluczowy do podjęcia skutecznej farmakoterapii, istnieje uzasadniona potrzeba poszukiwania nowej strategii terapeutycznej charakteryzującej się rozszerzonym oknem terapeutycznym i zminimalizowanymi skutkami ubocznymi.

Choroba Alzheimera jest wieloczynnikową chorobą neurodegeneracyjną prowadzącą do postępującej utraty pamięci spowodowanej obumieraniem neuronów i atrofią mózgu. Cechami charakterystycznymi choroby Alzheimera jest obecność pozakomórkowych, nierozpuszczalnych złożeń  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) oraz wewnątrzkomórkowych splątków białka tau. Obecnie choroba Alzheimera dotyka prawie 50 milionów ludzi na całym świecie i przewiduje się, że do 2050 roku liczba ta ulegnie potrojeniu (Scheltens i wsp., 2021; Jang i Park, 2022). Choroba Alzheimera może mieć zarówno dziedziczną, jak i sporadyczną etiologię, jednak za ponad 95% przypadków odpowiada jej sporadyczna forma, której początek objawów przypada powyżej 65 roku życia. Powszechnie uważa się, że neurodegeneracja w chorobie Alzheimera wynika z odkładania się płytek składających się z oligomerów  $A\beta$  oraz akumulacji splątków neurofibrylarnych nadmiernie ufosforylowanego białka tau. Istnieje jednak wiele nieścisłości dotyczących głównego czynnika leżącego u podstaw rozwoju i progresji choroby Alzheimera (Morris i wsp. 2014; Musiek i Holtzman, 2015). Rozszerzona hipoteza sporadycznej choroby

Alzheimera sugeruje, że po zgromadzeniu wystarczającej ilości złogów A $\beta$  następuje kaskada inicjowana amyloidem rozpoczynająca się hiperfosforylacją białka tau i prowadząca do neurozapalenia, utraty synaps i śmierci neuronów (Herrup, 2010). Coraz częściej podnosi się hipotezę, że kaskada amyloidowa ma miejsce na długo przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby, prawdopodobnie z powodu ograniczonej neurogenezy w wieku dorosłym lub połączonego efektu zależnego od stresu oksydacyjnego i nieznacznie podwyższonego poziomu A $\beta$  (Stockburger i wsp., 2014). Obecnie stosowane terapie w leczeniu choroby Alzheimera są ukierunkowane na zaburzone neuroprzebieżnictwo, przede wszystkim cholinergiczne i glutaminianergiczne. Jednak warto podkreślić, że terapie jak np. memantyna zapewniają jedynie umiarkowane złagodzenie objawów choroby, bez wpływu na jej progresję. Do chwili obecnej nie ma skutecznego leczenia, które mogłoby odwrócić czy chociaż zatrzymać postęp choroby Alzheimera. Z tego powodu niezwykle ważne jest poszukiwanie nowych, bezpiecznych i selektywnych związków, które przede wszystkim hamowałyby progresję choroby.

Płeć wydaje się być ważnym czynnikiem wpływającym na ryzyko zachorowania na udar mózgu oraz chorobę Alzheimera. Kobiety w przedziale wieku od 45 do 74 lat mają mniejsze ryzyko wystąpienia udaru i niższą śmiertelność niż mężczyźni w tym samym wieku (Jiang i wsp. 2020). Ta obserwacja została potwierdzona w zwierzęcym modelu udaru polegającym na zamknięciu tętnicy środkowej mózgu (MCAO), w którym samice wykazywały niższy stopień uszkodzenia mózgu i nieco mniejsze deficyty neurologiczne niż samce (Murphy i wsp. 2004, Haast i wsp. 2012). Jednak powyżej 75 roku życia, współczynnik zapadalności na udar mózgu jest znacznie wyższy u kobiet niż u mężczyzn. W przypadku choroby Alzheimera, sytuacja wygląda podobnie; częstość występowania schorzenia jest co najmniej dwukrotnie wyższa u kobiet niż u mężczyzn. Uważa się, że za zwiększonym ryzykiem zapadalności na chorobę Alzheimera wraz z wiekiem kryje się utrata hormonów steroidowych zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Przypuszcza się, że u kobiet po menopauzie, nagłe zmniejszenie ilości estrogenów i progestagenów zwiększa podatność na patogenezę amyloidozy. Podobnie, związana z wiekiem utrata testosteronu zwiększa ryzyko choroby u mężczyzn (Pike i wsp. 2009, Dubal, 2020). Metaanaliza transkryptomu osób cierpiących na chorobę Alzheimera ujawniła centralną rolę niedoboru steroidów płciowych w degeneracji neuronów hipokampa podczas progresji choroby (Winkler i Fox, 2013). Nawet w przypadku niedotlenienia okołoporodowego można zaobserwować różnicę w przebiegu schorzenia w zależności od płci. U chłopców odnotowuje się wyższą śmiertelność i większy ubytek masy mózgowia wynikający z niedotlenienia niż

u dziewczynek. Zauważono, że u chłopców zachodzi aktywacja ścieżek kaspazo-niezależnych, zaś u dziewczynek skutkiem niedotlenienia jest aktywacja ścieżki zależnej od kaspaz, co prowadzi do łżejszego przebiegu (Murden i wsp. 2019).

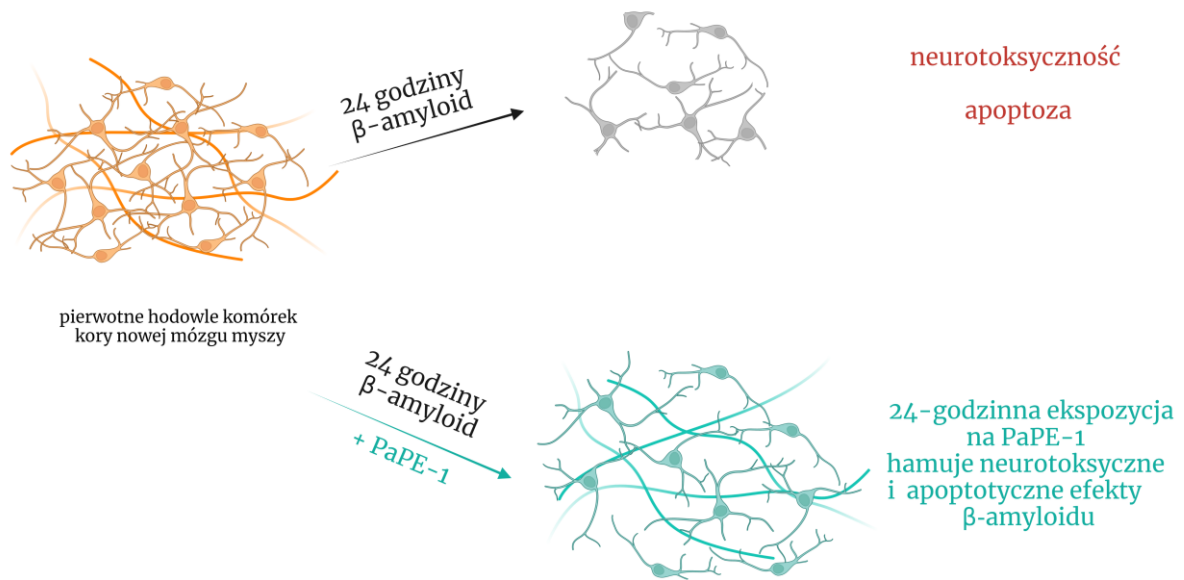
### **Blonowe receptory estrogenowe jako punkty uchwytu dla nowoczesnych terapii chorób neurodegeneracyjnych**

Najbardziej logicznym wyjaśnieniem zależnych od płci różnic w etiologii chorób układu nerwowego są hormony steroidowe, zwłaszcza estrogeny. Dla przykładu udowodniono, że polimorfizmy genetyczne receptora ESR1, szczególnie polimorfizm ESR1 rs2234693, są skorelowane ze zwiększonym ryzykiem udaru i choroby Alzheimera (Gao i wsp. 2013, Fu i wsp. 2019, Sumirtanurdin, Federoff 2019).

Mając na uwadze fakt, iż aktywacja błonowych receptorów estrogenowych może mieć silne działanie neuroprotekcjne pozbawione efektów ubocznych, celem moich badań była weryfikacja neuroprotekcjnego potencjału substancji PaPE-1 w komórkowych modelach hipoksji, ischemii oraz choroby Alzheimera. PaPE-1 (Pathway Preferential Estrogen-1, ((S)-5-(4-hydroksy-3,5-dimetylo-fenylo)-indan-1-ol)) jest substancją, która w sposób selektywny oddziałuje z receptorami mER $\alpha$  i mER $\beta$  (wykazuje 50 000 razy mniejsze powinowactwo do jądrowych receptorów estrogenowych), a równocześnie nie aktywuje receptora GPER1. PaPE-1 ma oryginalny sposób działania, szczególnie biorąc pod uwagę okres półtrwania kompleksu PaPE-1 z receptorami estrogenowymi; interakcja ta wynosi bowiem mniej niż minutę, co w porównaniu do kompleksu estradiol : receptory estrogenowe, trwającego ponad 30 godzin, jest bardzo korzystne. Ten krótki okres wiązania jest wystarczający do aktywacji kaskad kinaz i jednocześnie niewystarczający do promowania transkrypcji genów poprzez receptory jądrowe. Wiadomo również, że PaPE-1 nie rekrutuje koaktywatorów/korepresorów procesu transkrypcji zależnych od receptorów estrogenowych co jest charakterystyczne dla E2, a jednocześnie, podobnie jak estradiol, silnie aktywuje szlaki MAPK i mTOR. PaPE-1 ma także interesujący profil farmakokinetyczny, ponieważ w ciągu 10 minut do 4 godzin po pojedynczej podskórnej iniekcji PaPE-1 (100  $\mu$ g), stężenie PaPE-1 we krwi drastycznie spada z około 400 ng/ml do mniej niż 50 ng/ml, zaś po upływie 24 godzin od pojedynczego podania, PaPE-1 jest całkowicie niewykrywalny w próbkach krwi myszy (Madak-Erdogan i wsp., 2016). Z klinicznego punktu widzenia istotnym jest też fakt, iż PaPE-1 nie oddziałuje w sposób typowy dla estradiolu na macicę, gruczoł mleczny i grasicę, ale ściśle naśladuje działanie estradiolu w tkankach metabolicznych i naczyniowych redukując tkankę tłuszczową, obniżając

stężenie triglicerydów we krwi oraz odbudowując śródbłonek naczyń. Ostatnio opublikowane dane wskazują także, że PaPE-1 wpływa ochronnie na tkankę wątroby znacząco zmniejszając poziom stłuszczenia w mysich modelach otyłości wywołanej dietą bądź niedoborem leptyny (Zuo i wsp. 2021). W 2018 roku grupa Selvaraj i wsp. wykazała, że selektywna aktywacja mER przez PaPE-1 obniża przedostawanie się limfocytów T i B do mózgu w modelu udaru niedokrwinnego MCAO zmniejszając tym samym odczyn zapalny w obrębie mózgu. Autorzy zaznaczyli także, że zastosowana przez nich terapia była pozbawiona charakterystycznych dla estradiolu niepożądanych efektów uterotroficzych i kancerogennych. Jednak wykorzystany przez tę grupę badawczą model badań wykazuje wiele ograniczeń, ze względu na wykorzystanie owariektomizowanych zwierząt oraz wszczepianie peletów z PaPE-1 przed wywołaniem uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwinnego, tj. w tzw. paradygmacie pre-treatmentu. Z klinicznego punktu widzenia, cytowane badania mają jednak niską wartość translacyjną.

Moje badania opublikowane w *Neurotoxicity Research* (2020) wskazują na silny efekt neuroprotekcyny wywołany aktywacją szlaków sygnałowych niejądrowych receptorów estrogenowych przy użyciu PaPE-1 w komórkowym modelu choroby Alzheimera ([publikacja nr 2](#)). W doświadczeniach wykorzystaliśmy komórkowy model sporadycznej postaci choroby Alzheimera, tj. pierwotne hodowle komórek kory nowej mózgu myszy w 7 dniu hodowli *in vitro*, które poddano działaniu A $\beta$  przez 6 i 24 godziny. W tym modelu, A $\beta$  (5 i/lub 10  $\mu$ M) inicjował apoptozę, co zostało stwierdzone na podstawie utraty błonowego potencjału mitochondrialnego, aktywacji kaspazy-3 oraz indukcji genów i białek związanych z apoptozą. Ponadto, efektem wywołanym przez A $\beta$  towarzyszył wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz zmniejszona żywotność komórek. W wyniku 24-godzinnej ekspozycji, PaPE-1 (5  $\mu$ M) hamował efekty wywołane przez A $\beta$ , o czym świadczą zmniejszone parametry neurotoksyczności i apoptozy obejmujące obniżenie aktywności kaspazy-3, LDH i stężenia ROS, normalizację potencjału błony mitochondrialnej oraz poprawę żywotności komórek. Terapia z wykorzystaniem PaPE-1 przywróciła także prawidłowy stosunek ekspresji białek BAX/BCL2. Fakty te sugerują, że neuroprotekcjne właściwości PaPE-1 wynikają głównie z hamowania mitochondrialnego szlaku apoptotycznego. Uzyskane przez nas wyniki pozycjonują PaPE-1 jako obiecującą strategię terapeutyczną wobec sporadycznej postaci choroby Alzheimera.

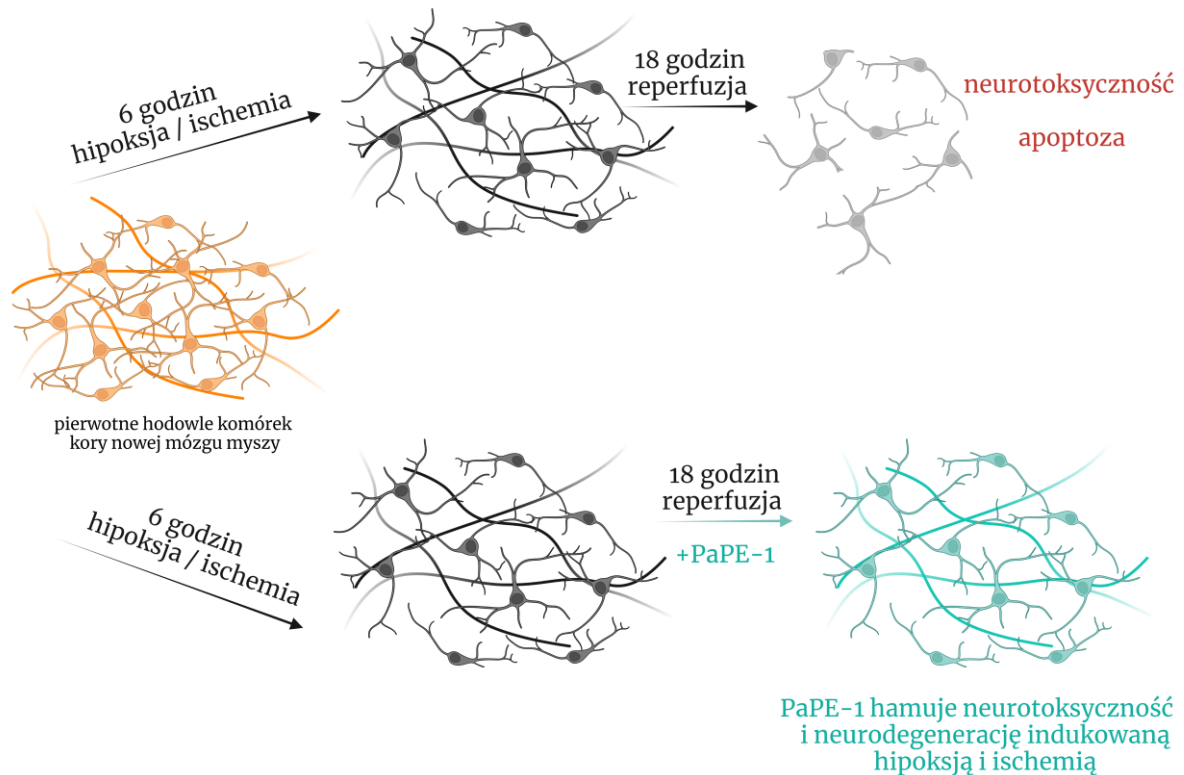


Wykonano za pomocą Biorender.com

Obecnie neuroprotektoryjne właściwości PaPE-1 w modelach sporadycznej choroby Alzheimera są badane w ramach kierowanego przez prof. Małgorzatę Kajta grantu NCN OPUS 20, którego jestem wykonawcą. Ochronne efekty działania PaPE-1 są przez nas weryfikowane w kontekście neurotoksyczności, procesów zapalnych mózgu, szlaków sygnałowych zależnych od PaPE-1, modyfikacji epigenetycznych i/lub deficytów pamięci i funkcji poznawczych z wykorzystaniem modeli mysich (*in vitro* i *in vivo*) i ludzkich (*in vitro*).

Moja kolejna publikacja z 2021 roku opublikowana w *Neurotoxicity Research* potwierdziła, że PaPE-1 wykazuje silny potencjał neuroprotektoryjny tym razem w kontekście uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwienne (publikacja nr 4). W tej pracy wykorzystaliśmy komórkowe modele udaru mózgu i niedotlenienia okołoporodowego *in vitro*, tj. pierwotne hodowle komórek kory nowej mózgu myszy w 7 dniu hodowli *in vitro* poddane warunkom hipoksji i/lub ischemii. Uzyskane wyniki wskazują, że PaPE-1 hamuje neurotoksyczność i neurodegenerację indukowaną hipoksją i ischemią, co zostało zweryfikowane testami LDH, Fluoro-Jade C oraz czerwieni obojętnej. Ponadto w neuroprotekcji wywołanej przez PaPE-1 pośredniczyło zmniejszenie syntezy ROS i przywrócenie komórkowej aktywności metabolicznej, która została rozregulowana z powodu niedotlenienia i niedokrwienia. Mechanizmy neuroprotektoryjnego działania PaPE-1 obejmowały również hamowanie procesu apoptozy przejawiające się normalizacją zarówno potencjału błony mitochondrialnej, jak

i poziomu ekspresji genów i białek związanych z apoptozą, takich jak *Fas*, *Fasl*, *Bcl2*, FAS, FASL, BCL2, BAX i GSK3 $\beta$ . Warty podkreślenia jest fakt, że aspekt kliniczny badań został uwzględniony poprzez zastosowanie po raz pierwszy PaPE-1 w sposób pourazowy, tj. 6 godzin po zainicjowaniu uszkodzenia niedotlenieniowo-niedokrwiennego.



Wykonano za pomocą Biorender.com

Nowa, pourazowa strategia leczenia udaru i asfiksji okołoporodowej oparta na selektywnej aktywacji błonowych receptorów estrogenowych mER $\alpha$  i mER $\beta$  z wykorzystaniem PaPE-1 jest tematem grantu NCN SONATA 17, którego jestem kierownikiem. Unikalne połączenie modeli *in vitro* i *in vivo*, w tym pierwotnych neuronów mysich, ludzkich neuronów pobudzających pochodzących z iPSC, ludzkich komórek mikrogleju i komórek śródbłonna, a także modeli zwierzęcych asfiksji okołoporodowej i udaru mózgu stworzy odpowiedni system do identyfikacji potencjału neuroprotekcynowego i mechanizmów działania PaPE-1 w paradygmacie pourazowym.

## Receptor PPAR $\gamma$ jako punkt uchwytu terapii chorób niedotlenieniowo-niedokrwiennych

Wiele badań eksperymentalnych i klinicznych łączy zaburzenie ekspresji i/lub funkcji PPAR $\gamma$  z chorobami ośrodkowego układu nerwowego. W ostatnim czasie wykazano, że polimorfizmy w genie *PPARG*, tj. rs1801282 C>G oraz rs3856806 C>T, zwiększają podatność na udar niedokrwienny w grupie etnicznej Han zamieszkującej północny rejon Chin (Wang i wsp. 2019, Cheng i wsp. 2021). Udowodniono także, że brak PPAR $\gamma$  w neuronach (badania z wykorzystaniem myszy ze specyficznym knockoutem genu *Pparg*) prowadzi do zwiększenia uszkodzenia mózgu i stresu oksydacyjnego w zwierzęcym modelu udaru mózgu - MCAO (Zhao et al., 2009). Ponadto, niedotlenienie/niedokrwienie mózgu wywołuje dysregulację ekspresji i funkcji PPAR $\gamma$ . W zależności od czasu niedotlenienia/niedokrwienia i późniejszej reperfuzji, poziom PPAR $\gamma$  jest silnie podwyższony (np. 24 godziny po 90 minutowym MCAO; 6-24 godziny po 4 godzinach w modelu deprywacji tlenu i glukozy - OGD) lub obniżony (np. 24 godziny po 2 godzinnym MCAO; 6 godzin po 15 minutowym OGD; po 72 h hipoksji) (Di i wsp. 2009, Galzio i wsp. 2012, Zeng i wsp. 2012, Yang i wsp. 2015, Pei i wsp. 2016). Mimo iż w niektórych badaniach nie zauważono zmian w ekspresji PPAR $\gamma$  w mózgach myszy poddanych procedurze MCAO (Li et al. 2017), normalizacja ekspresji i/lub aktywności PPAR $\gamma$  może być sposobem na ochronę neuronów przed niedotlenieniem i/lub niedokrwieniem.

Spośród ligandów PPAR $\gamma$  najkorzystniejszymi dla komórek neuronalnych powinni być agoniści jako atrakcyjne źródło do projektowania nowych leków przeciwko zaburzeniom niedotlenieniowo/niedokrwiennym. Dotychczas badanymi substancjami przeciwko udarowi niedokrwiennemu mózgu były związki z grupy tiazolidynodionów (TZD). Są to substancje o właściwościach pełnych agonistów PPAR $\gamma$ , które znalazły zastosowanie jako leki przeciwcukrzycowe. Do grupy TZD, zaliczamy substancje takie jak pioglitazon i rozyglitazon. Pomimo wielu pozytywnych efektów TZD w badaniach przedklinicznych, badania kliniczne wykazały, że ani rozyglitazon, ani pioglitazon nie przyniosły pozytywnych wyników. Co gorsza, podawanie TZD wiązało się z wieloma działaniami niepożądanymi, w tym hepatotoksycznością, zwiększonym ryzykiem powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego i kancerogennością (Nissen i Wolski, 2010; Viscoli i wsp., 2017; Zhong i wsp., 2018; Tang i wsp., 2018; El-Din i wsp., 2021).

Nowoczesna i bezpieczniejsza terapia przeciw uszkodzeniom niedotlenieniowo /niedokrwiennym, która nie wywołałaby poważnych skutków niepożądanych może opierać się na selektywnej modulacji PPAR $\gamma$  zamiast na całkowitym agonizmie tego receptora. Selektywne modulatory PPAR $\gamma$  (SPPAR $\gamma$ M) aktywują receptor w odrębny sposób niż pełny agonista,

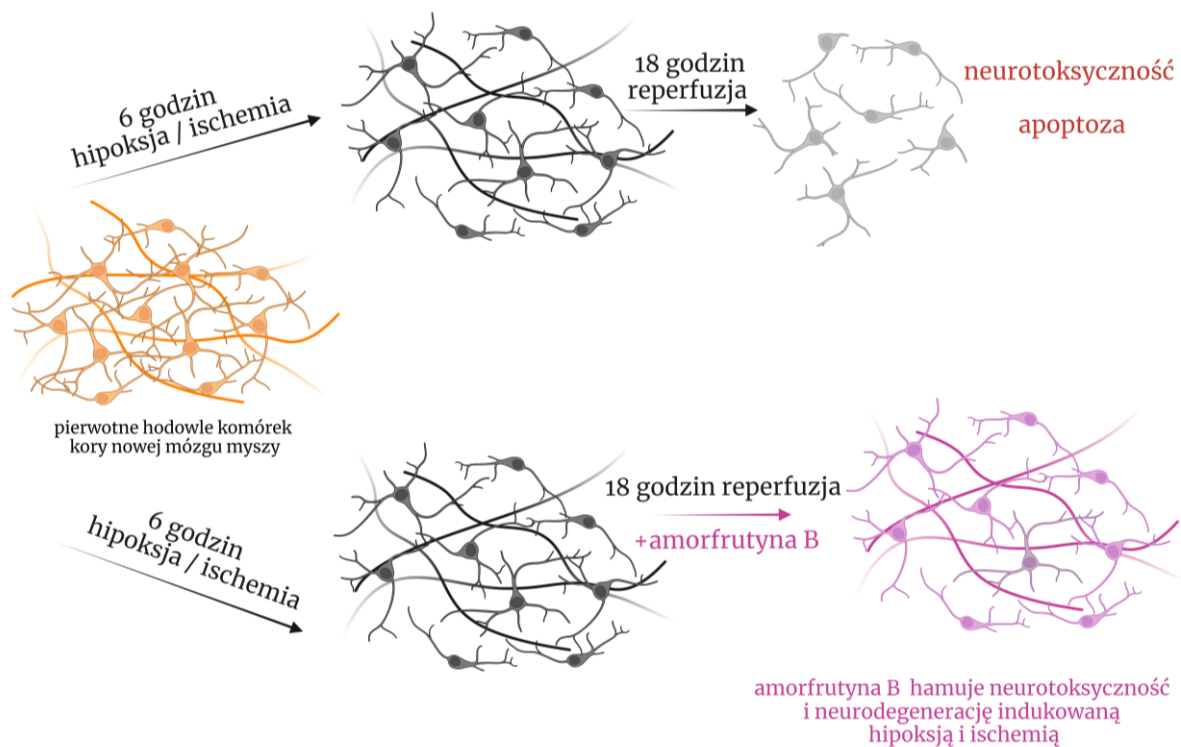


a mianowicie poprzez modulowanie oddziaływania PPAR $\gamma$  z aktywatorami lub represorami transkrypcji. Ponadto SPPAR $\gamma$ M w unikalny sposób wiąże się z receptorem, co skutkuje zmniejszoną stabilnością konformacyjną w porównaniu z pełnymi agonistami (Balint i Nagy, 2006).

Ciekawym kandydatem do badań eksperymentalnych jest należąca do grupy SPPAR $\gamma$ M - amorfrutyna B wyizolowana z krzewu z rodziny bobowatych, *Amorpha fruticosa*. Badania z wykorzystaniem modeli *in vitro* i *in vivo* wykazały, że amorfrutyna B aktywuje podzbiór genów pod kontrolą PPAR $\gamma$  w sposób selektywny, unikając poważnych skutków ubocznych typowych dla TZD (Chen i in., 2018). Dotychczas dowiedziono, że amorfrutyna B, zastosowana u myszy z zaburzeniami metabolicznymi, silnie zmniejsza insulinooporność, stłuszczenie wątroby i dyslipidemię poprzez selektywną aktywację PPAR $\gamma$ . Co ważne, badania te nie wykazały niekorzystnego wpływu na osteoblastogenezę, retencję płynów i przyrost masy ciała, tj. charakterystycznych efektów ubocznych TZD (Weidner i wsp., 2013; Lavecchia i Di Giovanni, 2015). Amorfrutyna B wykazuje szereg innych efektów biologicznych, w tym posiada właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne (Fuhr i wsp., 2015; Liu i wsp., 2018; Xu i wsp., 2018). Pomimo tych obiecujących danych, amorfrutyna B nie była jeszcze badana w modelach chorób neurodegeneracyjnych.

Moje badania opublikowane w 2021 w *Biomedicines*, po raz pierwszy identyfikują amorfrutynę B jako substancję o neuroprotekcyjnym działaniu w komórkowych modelach udaru niedokrwienego i asfiksji okołoporodowej ([publikacja nr 3](#)). Podobnie jak w przypadku PaPE-1, aby uwzględnić aspekt translacyjny naszych badań, amorfrutyna B była podawana po 6 godzinach od zainicjowania uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego. Z naszych badań wynika, że amorfrutyna B jest substancją o silnym potencjale neuroprotekcyjnym opierającym się na aktywacji receptora PPAR $\gamma$  w neuronach mózgu ssaków. Zostało to potwierdzone dzięki zastosowaniu selektywnego antagonisty receptora PPAR $\gamma$ , który zniósł neuroprotekcyjne działanie amorfrutyny B, wskazując na agonistyczne działanie substancji na ten receptor. Neuroprotekcyjny potencjał amorfrutyny B został wykazany w kontekście procesów neurotoksyczności i neurodegeneracji indukowanych warunkami hipoksyjno-ischemicznymi. Efekty amorfrutyny B w komórkach nerwowych wykraczają poza działanie na parametry neurotoksyczności, ponieważ substancja ta modyfikuje także poziom metylacji promotora genu *Pparg*, nie wpływając jednocześnie na globalny poziom metylacji DNA.





Wykonano za pomocą Biorender.com

Neuroprotektoryjne właściwości amorfrutyny B są badane w ramach grantu NCN OPUS 16, kierowanego przez prof. Małgorzatę Kajta, którego jestem wykonawcą. Efekty działania amorfrutyny B są przez nas weryfikowane zarówno w modelach udaru niedokrwienego mózgu *in vitro*, jak i *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego udaru fotozkrzepowego.

### **Znaczenie szlaków angażujących receptory estrogenowe oraz receptory dla ksenobiotyków w neurotoksycznych mechanizmach działania triklokarbanu i DDE.**

Stwierdzono, że szlaki sygnałowe receptorów estrogenowych są niezbędne do prawidłowego rozwoju mózgu, a ich upośledzenie może być przyczyną zaburzeń obserwowanych zarówno w czasie ontogenezy, jak i w przebiegu chorób układu nerwowego. Receptor ER $\alpha$ /ESR1 jest wiązany z etiologią schizofrenii oraz choroby Alzheimera, ponieważ jego znaczne deficyty zostały wykazane w przebiegu tych zaburzeń (Perlman i wsp. 2005, Kelly i wsp. 2008). Ponadto, deficyt receptorów ESR1 u myszy skutkuje znacznym nagromadzeniem złogów A $\beta$ , ograniczeniem funkcji pamięciowych oraz uogólnioną neuroinflamacją, co wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie receptora ESR1 w etiologię choroby Alzheimera (Hwang i wsp.

2015, Yun i wsp. 2018). Oprócz receptora ESR1, także pozostałe receptory estrogenowe są czynnie zaangażowane w prawidłową homeostazę OUN. Podczas neurorozwoju, niedobór receptora ESR2 objawia się znacznym ograniczeniem neurogenezy i plastyczności synaptycznej oraz nadmierną aktywacją gleju, zaś receptor GPER1 odgrywa istotną funkcję w kontroli lęku i stresu (Wang i wsp. 2003, Kastenberger i Schwarzer 2014, Nalvarte i wsp. 2021). Ponadto, istnieje szereg prac traktujących o wpływie estrogenów na rozwój depresji oraz innych chorób psychicznych. Jest to bezpośrednio związane z rolą ER jako czynników transkrypcyjnych, modulujących działanie neuroprzekaźników, w tym serotoniny i noradrenaliny, a polimorfizmy w obrębie genu *ESR1* są skorelowane z zaburzeniami depresyjnymi u kobiet oraz zaburzeniami nastroju wieku dziecięcego (Mill i wsp. 2008, Sundermann i wsp. 2010, Ryan i wsp., 2011). Mając na uwadze tak ogromne zaangażowanie ścieżek sygnałowych receptorów ER w neurozwoj i homeostazę układu nerwowego, można mówić o bezpośrednim udziale EDCs w etiologii chorób układu nerwowego.

Ostatnie dane wskazują, że podczas ostrego udaru niedokrwienego i choroby Alzheimera dochodzi do zwiększonej ekspresji receptora AHR, co prowadzi do zaawansowanej astroglejozy oraz zahamowania neurogenezy (Chen i wsp. 2019, Ramos-García i wsp. 2020). Odnośnie CAR, badania populacyjne wykazały, że mutacja w obrębie jego genu występuje u osób dotkniętych zespołem Kleefstra charakteryzującym się opóźnieniem umysłowym, zaburzeniami behawioralnymi i intelektualnymi, a brak receptora CAR u myszy skutkuje zaburzeniami lękowymi oraz deficytami pamięci (Oliviero i wsp. 2020).

Ponadto należy pamiętać, że nadrzędnymi mechanizmami regulacyjnymi, które koordynują rozwój mózgu poprzez zmianę ekspresji szeregu genów, są procesy epigenetyczne. Udowodniono, że zaburzenia epigenetyczne ze szczególnym naciskiem na nieprawidłową metylację DNA prowadzą do zaburzeń OUN, a analizy globalnej metylacji DNA wykazały przydatność oceny epigenomu w badaniach klinicznych pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi i/lub neurodegeneracjami, w tym autyzmu, schizofrenii czy demencji.

Triklokarban (3,4,4'-trichlorokarbanilid) jest eterem fenylovym, który wykazuje działanie antybakteryjne i jest powszechnie dodawany m.in. do środków czystości i higieny osobistej. Z kolei DDE, czyli dichlorodifenyldichloroetylen jest metabolitem używanego nadal w wielu krajach pestycydu DDT. Istnieje szereg dowodów na obecność triklokarbanu i DDE w tkankach człowieka, jednak wiedza na temat ich wpływu na układ nerwowy, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju jest niewielka. W badaniach populacyjnych zaobserwowano, że dwukrotnie wyższy poziom DDE w krwi pępowinowej koreluje z nadaktywnością ruchową u 7-letnich

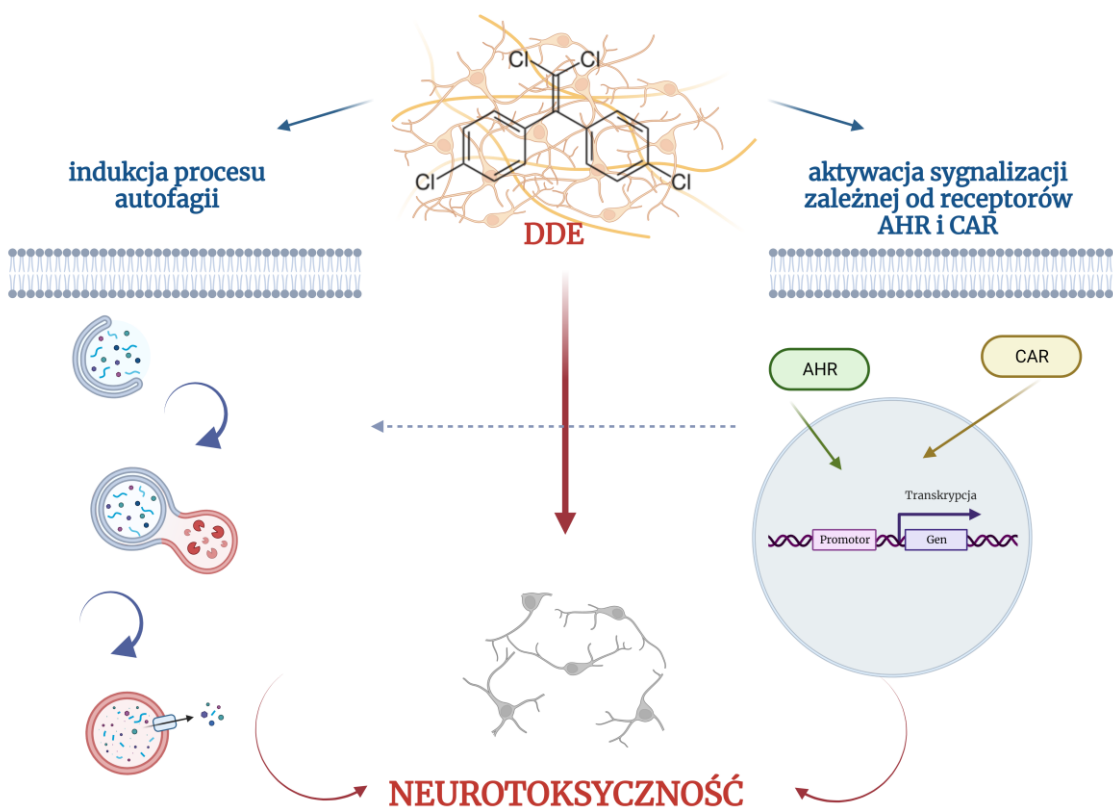
dziewczynek (Sioen i wsp. 2013). Wysoki poziom DDE stwierdzono również w mózгах i krwi osób z chorobą Alzheimera i Parkinsona (Hatcher i wsp. 2008, Richardson i wsp. 2014). Badania z wykorzystaniem szczurzego modelu narażenia na triklokarban podczas laktacji wskazały na obniżoną przeżywalność miotów narażonych na tę substancję (Kennedy i wsp. 2015). Natomiast w populacji Puerto Rico narażenie na triklokarban silnie korelowało ze skróceniem okresu ciąży (Aker i wsp. 2019). Brakuje jednak danych na temat mechanizmów działania powyższych substancji w neuronach ssaków. Wiedza na ten temat pozwoli stworzyć strategię terapeutyczne nakierowane bezpośrednio na zaburzone przez te substancje procesy endogenne niezbędne do prawidłowego neurorozwoju. Co więcej badania nad działaniem triklokarbanu czy pestycydu DDE mogą przyczynić się do wycofania lub też kontrolowanego użycia tych substancji przez człowieka.

Do niedawna brakowało informacji na temat mechanizmów działania DDT, DDE i triklokarbanu w komórkach nerwowych, szczególnie na wczesnych etapach rozwoju. Początkowo podjęliśmy badania związane z neurotoksycznością pestycydu DDT, czyli dichlorodifenylotrichloroetanu, który jest do dziś stosowany do zwalczania wektora chorobotwórczego malarii i wirusa Zika. Nasze badania jako pierwsze wskazały, że DDT działa cytotoksycznie i apoptotycznie w embrionalnych komórkach nerwowych w hodowli pierwotnej *in vitro*, a prenatalna ekspozycja na tę substancję wywołuje zmiany o charakterze depresyjnym, którym towarzyszy spadek poziomu serotoniny i receptora serotoninowego 5-HT<sub>1A</sub>, obniżona ekspresja receptorów estrogenowych, a także hipometylacja DNA (Kajta i wsp. 2014, Kajta i wsp. 2017). Według naszych badań, mechanizm działania DDT w modelach *in vitro* i *in vivo* polega na upośledzeniu klasycznych receptorów estrogenowych, a jego neurotoksyczność wiąże się przede wszystkim z nasileniem szlaków angażujących receptor AHR. Nasze badania skupiły się także na głównym produkcie środowiskowej degradacji i metabolizmu DDT, czyli dichlorodifenylodichloroetylenie, w skrócie DDE. Pomimo informacji, że DDE przenika barierę krew-łożysko, niewiele było wiadomo na temat toksyczności i mechanizmów działania tej substancji na wczesnych etapach rozwoju układu nerwowego. Wyniki naszych badań dowiodły, że DDE inicjuje apoptozę zależną od kaspazy-3 i powoduje globalną hipometylację DNA w embrionalnych komórkach nerwowych myszy, przy czym stymulacja wewnątrzkomórkowej sygnalizacji RXR $\alpha$  i RXR $\beta$  odgrywa ważną rolę w propagowaniu procesu apoptozy wywoływanej przez DDE, zwłaszcza we wczesnych stadiach rozwoju neuronalnego (Wnuk i wsp. 2016).

W mojej najnowszej pracy opublikowanej w *Science of the Total Environment* (2020) wchodzącej w skład dzieła habilitacyjnego po raz pierwszy wykazano, że neurotoksyczne działanie DDE w komórkach kory nowej mózgu myszy *in vitro* obejmuje proces autofagii (publikacja nr 1). Autofagia odgrywa kluczową rolę w homeostazie komórkowej poprzez usuwanie nieprawidłowo sfałdowanych białek i uszkodzonych organelli. Jednak rola procesu autofagii w zaburzeniach OUN jest skomplikowana i nie jest do końca poznana. Autofagia wydaje się bowiem być korzystna, w przebiegu chorób charakteryzujących się złogami białkowymi, takich jak choroba Alzheimerera, choroba Parkinsona lub choroba Huntingtona, a jednocześnie towarzyszy apoptozie podczas udaru niedokrwiennego mózgu. Pomimo, że często autofagia jest uważana za mechanizm cytoprotekcyjny, od bezpośredniej równowagi między apoptozą i autofagią zależy los komórek. I rzeczywiście, upośledzenie na dowolnym etapie ścieżki autofagowej lub nienormalnie zwiększona jej aktywność może prowadzić do utraty homeostazy neuronów, indukując apoptozę. Dlatego uważa się, że autofagia odgrywa rolę „miecza obosiecznego” w układzie nerwowym, a utrzymanie jej homeostazy jest niezwykle ważne. Zaburzona homeostaza między procesami apoptozy i autofagii jest bezpośrednio związana z rozwojem chorób układu nerwowego. Korelacja między tymi procesami jest silnie modulowana przez receptory steroidowe i ksenobiotyczne, które działają głównie jako czynniki transkrypcyjne.

Według naszych badań DDE stymuluje proces autofagii, o czym świadczą podwyższone poziomy markerów autofagii w tym *Becn1*, *Map1lc3a*/MAP1LC3A, *Map1lc3b* i *Nup62*/NUP62 oraz zwiększona ilość powstających autofagosomów. Aby dostarczyć dodatkowych dowodów na to, że autofagia odgrywa kluczową rolę w neurotoksyczności indukowanej DDE, zastosowaliśmy specyficzne siRNA, które degradowały mRNA dla *Becn1* i *Atg7*. W wyniku tych doświadczeń wykazaliśmy, że wyciszenie kluczowych dla autofagii czynników, takich jak *Becn1* i *Atg7*, hamowało neurotoksyczność indukowaną przez *p,p'*-DDE i *o,p'*-DDE, o czym świadczą zmniejszone poziomy uwalnianego LDH. Co więcej, wyciszenie czynników związanych z autofagią zmniejszyło aktywność kaspazy-3 indukowanej przez *p,p'*-DDE i *o,p'*-DDE potwierdzając, że zarówno apoptoza, jak i autofagia są niezbędne do wywołania neurotoksyczności indukowanej przez DDE. Oprócz dostarczenia dowodów na udział apoptozy i autofagii w neurotoksycznym działaniu DDE, w obecnej pracy wykazaliśmy kluczową rolę receptorów AHR i CAR w tych procesach. Selektyni antagoniści badanych receptorów, w tym alfa-naftoflawon, CH223191 i CINPA 1, hamowali efekty indukowane przez *p,p'*-DDE i *o,p'*-DDE tj. uwalnianie LDH i aktywność kaspazy-3, podczas gdy

specyficzne siRNA (*Ahr* i *Car* siRNA) obniżały poziom autofagosomów indukowanych przez izomery DDE. Powyższe wyniki zostały poparte indukowanymi przez DDE wzrostami ekspresji mRNA i białek AHR i CAR, co zostało zweryfikowane technikami qPCR, ELISA oraz barwieniem immunofluorescencyjnym połączonym z mikroskopią konfokalną. Co interesujące, wpływ DDE na ekspresję mRNA genów *Ahr*, *Arnt* i *Car* był zależny od zastosowanego izomeru; *o,p'*-DDE zmieniało wyłącznie poziom mRNA dla *Car* zaś *p,p'*-DDE zmieniało ekspresję wszystkich badanych mRNA tj. *Ahr*, *Arnt* i *Car*. Na poziomie ekspresji białka nie obserwowaliśmy efektów specyficznych dla poszczególnych izomerów. Podsumowując, nasze oryginalne dane wykazały, że neurotoksyczność wywołana przez DDE angażuje zarówno proces apoptozy, jak i autofagii w czym aktywnie uczestniczą receptory dla ksenobiotyków - AHR i CAR.



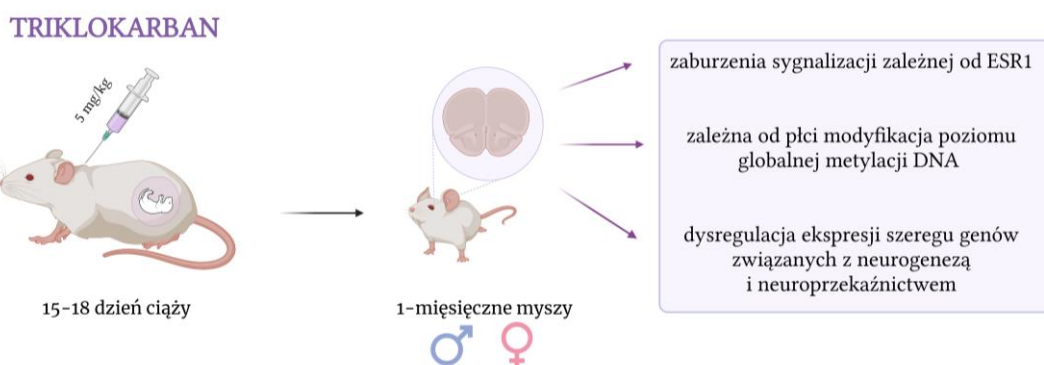
Wykonano za pomocą Biorender.com

Równocześnie, nasze badania skupiły się na molekularnych mechanizmach działania triklokarbanu w komórkach nerwowych myszy. Nasze początkowe analizy związane z toksycznością tej substancji wykazały, że nie tylko inicjuje ona apoptozę w komórkach nerwowych myszy w hodowli pierwotnej *in vitro*, ale także hamuje sumoilację i zmienia status epigenetyczny komórek poprzez zmianę aktywności HDAC, sirtuin i DNMT oraz globalną hipometylację DNA (Kajta i wsp. 2019).

Nasze poprzednio opublikowane badania w *Science of the Total Environment* (2020) dowodzą, że ekspozycja na triklokarban (10  $\mu$ M) hamuje ekspresję mRNA i białek ESR1 i GPER1, lecz nie ESR2, co zostało wprost powiązane z hipermetylacją genów dla *Esr1* i *Gper1*. Badania funkcjonalne dowiodły, że selektywni antagoniści receptorów estrogenowych, mianowicie MPP, PHTPP i G15, nasilają działanie triklokarbanu, co sugeruje, że neurotoksyczność triklokarbanu, oprócz zmniejszenia ekspresji receptorów estrogenowych, odbywa się także poprzez hamowanie ich zdolności neuroprotekcyjnych. Nasze doświadczenia wykazały, że neurotoksyczne działanie triklokarbanu polega nie tylko na zaburzeniu sygnalizacji receptorów estrogenowych, ale także na upośledzeniu endogennego procesu autofagii (Kajta i wsp., 2020).

Idąc krok dalej, kolejnym etapem naszych badań było ustalenie wpływu prenatalnej ekspozycji na triklokarban na procesy neurorozwojowe ssaków. W moim artykule opublikowanym w 2021 roku w *International Journal of Molecular Sciences*, będącym częścią dzieła habilitacyjnego, wykorzystaliśmy model w którym triklokarban podawano ciężarnym myszom w dawce 5 mg/kg od 15 do 18 dnia ciąży ([publikacja nr 5](#)). Dzięki tym eksperymentom po raz pierwszy wykazaliśmy, że ekspresja mRNA i białka ESR1 była zaburzona w mózгах jednomiesięcznych myszy prenatalnie narażonych na triklokarban. Obniżony poziom ekspresji *Esr1*/ESR1, a także hipermetylację genu *Esr1* zaobserwowaliśmy zarówno w korze mózgowej samców, jak i samic pokolenia F1. Oprócz upośledzenia ekspresji *Esr1*/ESR1, prenatalna ekspozycja na triklokarban zmniejszyła poziom ekspresji mRNA *Esr2*, *Gper1*, *Ahr*, *Arnt*, *Cyp19a1*, *Cyp11a1* i *Atg7* oraz poziom białek CAR, ARNT i MAP1LC3AB w mózгах samic i obniżyła poziom białek BCL2, ARNT i MAP1LC3AB w mózгах samców. Zastanawiające jest, że prenatalna ekspozycja na triklokarban nie wywołała zmian w ekspresji genów i białek związanych z procesami apoptozy i autofagii, z wyjątkiem spadku ekspresji BCL2 u samców, hamowania ekspresji genu *Atg7* u samic myszy i obniżenia ekspresji MAP1LC3AB u myszy obu płci poddanych prenatalnej ekspozycji na triklokarban. Najbardziej interesującym i zarazem niepokojącym jest fakt, że prenatalna ekspozycja na triklokarban rozregulowała ekspresję szeregu genów związanych z neurogenezą i neuroprzebieżnością oraz

modyfikowała poziom globalnej metylacji DNA w sposób zależny od płci. W przypadku samców, triklokarban wywołał hipermetylację DNA i zaburzył głównie szlaki związane z neurogenezą, podczas gdy u samic związek ten wywołał hipometylację DNA i silniej wpłynął na szlaki związane z neuroprzekaznictwem. W pracy wykonano także tzw. analizę wzbogacenia (z ang. *enrichment analysis*), która wskazała, że spadek ekspresji genów takich jak m.in. *Bdnf*, *Gdnf*, *Map2* u samców jest silnie związany z rozwojem przodomózgowia i kresomózgowia, jak i gliogenezą. Natomiast upośledzona ekspresja genów takich jak m.in., *Gabra1*, *Gria1*, *Grin2a* u samic myszy wpływa głównie na rozwój synaptyczny, szczególnie na regulację potencjału błony postsynaptycznej, regulację egzocytozy pęcherzyków synaptycznych i neuroprzekaznictwo glutaminergiczne. Dodatkowo, w tej pracy wykorzystaliśmy nowoczesny model bariery krew-mózg, dzięki któremu udowodniliśmy, że triklokarban przenika przez nią z bardzo dobrą efektywnością, wykazując współczynnik przenikalności przez barierę krew-mózg (współczynnik  $P_{app}$ ) o wartości  $21 \times 10^{-6}$  cm/s.



Wykonano za pomocą Biorender.com

Te oryginalne dane identyfikują triklokarban jako neurorozwojowy czynnik ryzyka, który w szczególności upośledza ekspresję ESR1, wpływa na czynniki związane z apoptozą i autofagią oraz zaburza ekspresję genów związanych z neurogenezą i neurotransmisją. Tym samym, prenatalna ekspozycja na triklokarban może predysponować do nieprawidłowości neurorozwojowych, które ujawnią się w okresie pourodzeniowym i mogą stanowić podstawę dla rozwoju chorób w dorosłym układzie nerwowym.

**Lista najczęściej używanych skrótów:**

**AHR** – receptor dla węglowodorów aromatycznych; **A $\beta$**  –  $\beta$ -amyloid; **CAR** – konstytutywny receptor dla androstanu; **DDE** – dichlorodifenylodichloroetylen; **EDCs** – substancje zaburzające funkcje endokrynne; **ER** – receptory estrogenowe; **GPER1 (GPR30)** – receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G; **mER** – błonowe receptory estrogenowe; **PPAR $\gamma$**  – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typu gamma; **SPPAR $\gamma$ M** – selektywne modulatory PPAR $\gamma$ ; **TZD** – tiazolidynodiony



## PODSUMOWANIE

1. Selektywny aktywator błonowych receptorów estrogenowych ( $mER\alpha$ ,  $mER\beta$ ), jakim jest PaPE-1, wywołuje silny efekt neuroprotekcyny w komórkowych modelach asfiksji okołoporodowej, udaru mózgu i choroby Alzheimera. Mechanizm działania PaPE-1 w modelach powyższych chorób polega głównie na hamowaniu stresu oksydacyjnego, nekrozy i apoptozy, zwłaszcza związanej ze szlakiem mitochondrialnym.
2. Selektywna modulacja receptora  $PPAR\gamma$  przez amorfrutynę B wpływa ochronnie na komórki nerwowe myszy. O jej silnym potencjale neuroprotekcynym świadczy fakt, że zachowuje ona swoje właściwości, nawet gdy jest podana 6 godzin po zainicjowaniu uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego. Działanie tej substancji wykracza poza parametry neurotoksyczności, ponieważ substancja ta modyfikuje poziom metylacji promotora genu *Pparg*, nie wpływając jednocześnie na globalny poziom metylacji DNA.
3. Prenatalna ekspozycja na substancję antybakteryjną jaką jest triklokarban upośledza szlaki sygnałowe receptora estrogenowego  $ER\alpha$  (*ESR1*) oraz rozregulowuje ekspresję genów zaangażowanych w neurogenezę i neurotransmisję. Co więcej, prenatalna ekspozycja na triklokarban w sposób zależny od płci zaburza poziom globalnej metylacji DNA, jak i poziom metylacji promotorów genów receptorów estrogenowych.
4. Narażenie embrionalnych komórek nerwowych na zanieczyszczenia środowiskowe jakimi są triklokarban i DDE prowadzi do rozregulowania endogenego procesu autofagii, zaburza szlaki receptorów estrogenowych i receptorów dla ksenobiotyków oraz zmienia status epigenetyczny komórek nerwowych mózgu.

## LITERATURA

1. Aker AM, Ferguson KK, Rosario ZY, Mukherjee B, Alshwabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. *The associations between prenatal exposure to triclocarban, phenols and parabens with gestational age and birth weight in northern Puerto Rico.* Environ Res. 2019 Feb;169:41-51. doi: 10.1016/j.envres.2018.10.030. Epub 2018 Oct 31.
2. Balint BL, Nagy L. *Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases.* Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2006 Mar;6(1):33-43. doi: 10.2174/187153006776056620.
3. Bano D, Nicotera P. *Ca<sup>2+</sup> signals and neuronal death in brain ischemia.* Stroke. 2007 Feb;38(2 Suppl):674-6. doi: 10.1161/01.STR.0000256294.46009.29.
4. Bonofiglio D, Gabriele S, Aquila S, Catalano S, Gentile M, Middea E, Giordano F, Andò S. *Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in breast cancer cells.* Clin Cancer Res. 2005 Sep 1;11(17):6139-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2453.
5. Bustamante-Barrientos FA, Méndez-Ruette M, Orloff A, Luz-Crawford P, Rivera FJ, Figueroa CD, Molina L, Bádiz LF. *The Impact of Estrogen and Estrogen-Like Molecules in Neurogenesis and Neurodegeneration: Beneficial or Harmful?* Front Cell Neurosci. 2021 Mar 8;15:636176. doi: 10.3389/fncel.2021.636176.
6. Cai W, Yang T, Liu H, Han L, Zhang K, Hu X, Zhang X, Yin KJ, Gao Y, Bennett MVL, Leak RK, Chen J. *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): A master gatekeeper in CNS injury and repair.* Prog Neurobiol. 2018 Apr-May;163-164:27-58. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.002. Epub 2017 Oct 12.
7. Canerina-Amaro A, Hernandez-Abad LG, Ferrer I, Quinto-Aleman D, Mesa-Herrera F, Ferri C, Puertas-Avendano RA, Diaz M, Marin R. *Lipid raft ER signalosome malfunctions in menopause and Alzheimer's disease.* Front Biosci (Schol Ed). 2017 Jan 1;9(1):111-126. doi: 10.2741/s476.
8. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Types of stroke.* (2020) cdc.gov [https://www.cdc.gov/stroke/types\\_of\\_stroke.htm](https://www.cdc.gov/stroke/types_of_stroke.htm)
9. Chen C, Xue Y, Li QM, Wu Y, Liang J, Qing LS. *Neutral Loss Scan - Based Strategy for Integrated Identification of Amorfrutin Derivatives, New Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists, from Amorpha Fruticosa by UPLC-QqQ-MS/MS and UPLC-Q-TOF-MS.* J Am Soc Mass Spectrom. 2018 Apr;29(4):685-693. doi: 10.1007/s13361-018-1891-4.
10. Chen WC, Chang LH, Huang SS, Huang YJ, Chih CL, Kuo HC, Lee YH, Lee IH. *Aryl hydrocarbon receptor modulates stroke-induced astrogliosis and neurogenesis in the adult mouse brain.* J Neuroinflammation. 2019 Oct 12;16(1):187. doi: 10.1186/s12974-019-1572-7.
11. Cheng F, Si XM, Yang GL, Zhou L. *Relationship between PPAR- $\gamma$  gene polymorphisms and ischemic stroke risk: A meta-analysis.* Brain Behav. 2021 Dec;11(12):e2434. doi: 10.1002/brb3.2434.
12. Chu R, van Hasselt A, Vlantis AC, Ng EK, Liu SY, Fan MD, Ng SK, Chan AB, Liu Z, Li XY, Chen GG. *The cross-talk between estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in thyroid cancer.* Cancer. 2014 Jan 1;120(1):142-53. doi: 10.1002/cncr.28383.
13. Culman J, Zhao Y, Gohlke P, Herdegen T. *PPAR-gamma: therapeutic target for ischemic stroke.* Trends Pharmacol Sci. 2007 May;28(5):244-9. doi: 10.1016/j.tips.2007.03.004.
14. Danladi J, Sabir H. *Perinatal Infection: A Major Contributor to Efficacy of Cooling in Newborns Following Birth Asphyxia.* Int J Mol Sci. 2021 Jan 12;22(2):707. doi: 10.3390/ijms22020707.
15. Di Z, Tian Y, Ma H, Du F, Lei H, Zhang G, Liang H. *Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hippocampus neurons in rats after oxygen deprivation/oxygen supply in vitro.* Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2009 Dec;34(12):1238-42.
16. Dubal DB. *Sex difference in Alzheimer's disease: An updated, balanced and emerging perspective on differing vulnerabilities.* Handb Clin Neurol. 2020;175:261-273. doi: 10.1016/B978-0-444-64123-6.00018-7.

17. El-Din SS, Abd Elwahab S, Rashed L, Fayez S, Aboulhoda BE, Heikal OA, Galal AF, Nour ZA. *Possible role of rice bran extract in microglial modulation through PPAR-gamma receptors in Alzheimer's disease mice model*. *Metab Brain Dis*. 2021 Oct;36(7):1903-1915. doi: 10.1007/s11011-021-00741-4.
18. Frajewicki A, Laštůvka Z, Borbélyová V, Khan S, Jandová K, Janišová K, Otáhal J, Mysliveček J, Riljak V. *Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities*. *Physiol Res*. 2020 Dec 31;69(Suppl 3):S379-S401. doi: 10.33549/physiolres.934595.
19. Frenzl A, Csiba L. *Pharmacological and non-pharmacological recanalization strategies in acute ischemic stroke*. *Front Neurol*. 2011 May 27;2:32. doi: 10.3389/fneur.2011.00032. PMID: 21660098; PMCID: PMC3105226.
20. Fu R, Shen Y, Zheng J. *Association between Common Genetic Variants in ESR1 and Stroke Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019 Nov;28(11):104355. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104355.
21. Fuhr L, Rousseau M, Plauth A, Schroeder FC, Sauer S. *Amorfrutins Are Natural PPAR $\gamma$  Agonists with Potent Anti-inflammatory Properties*. *J Nat Prod*. 2015 May 22;78(5):1160-4. doi: 10.1021/np500747y.
22. Galzio R, Cristiano L, Fidoamore A, Cifone MG, Benedetti E, Cinque B, Menghini P, Raysi Dehcordi S, Ippoliti R, Giordano A, Cimini A. *Hypoxia modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human glioblastoma stem cells. Implications for therapy*. *J Cell Biochem*. 2012 Nov;113(11):3342-52. doi: 10.1002/jcb.24210.
23. Gao HH, Gao LB, Wen JM. *Genetic polymorphisms in the ESR1 gene and cerebral infarction risk: a meta-analysis*. *DNA Cell Biol*. 2014 Sep;33(9):605-15. doi: 10.1089/dna.2013.2270.
24. Gray NE, Zweig JA, Kawamoto C, Quinn JF, Copenhaver PF. *STX, a Novel Membrane Estrogen Receptor Ligand, Protects Against Amyloid- $\beta$  Toxicity*. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(2):391-403. doi: 10.3233/JAD-150756.
25. Haast RA, Gustafson DR, Kiliaan AJ. *Sex differences in stroke*. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Dec;32(12):2100-7. doi: 10.1038/jcbfm.2012.141.
26. Hatcher JM, Delea KC, Richardson JR, Pennell KD, Miller GW. *Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites*. *Neurotoxicology*. 2008 Jul;29(4):682-90. doi: 10.1016/j.neuro.2008.04.010.
27. Herrup K. *Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis*. *J Neurosci*. 2010 Dec 15;30(50):16755-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4521-10.2010.
28. Hwang CJ, Yun HM, Park KR, Song JK, Seo HO, Hyun BK, Choi DY, Yoo HS, Oh KW, Hwang DY, Han SB, Hong JT. *Memory Impairment in Estrogen Receptor  $\alpha$  Knockout Mice Through Accumulation of Amyloid- $\beta$  Peptides*. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):176-86. doi: 10.1007/s12035-014-8853-z.
29. Jang J, Park CB. *Magnetolectric dissociation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid aggregates*. *Sci Adv*. 2022 May 13;8(19):eabn1675. doi: 10.1126/sciadv.abn1675.
30. Jiang M, Ma C, Li H, Shen H, Li X, Sun Q, Chen G. *Sex Dimorphisms in Ischemic Stroke: From Experimental Studies to Clinic*. *Front Neurol*. 2020 Jun 19;11:504. doi: 10.3389/fneur.2020.00504.
31. Jilani TN, Siddiqui AH. *Tissue Plasminogen Activator*. 2022 Feb 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
32. Kajta M, Litwa E, Rzemieniec J, Wnuk A, Lason W, Zelek-Molik A, Nalepa I, Grzegorzewska-Hiczwa M, Tokarski K, Golas A, Guzik E, Grochowalski A, Szychowski KA, Wojtowicz AK. *Isomer-nonspecific action of dichlorodiphenyltrichloroethane on aryl hydrocarbon receptor and G-protein-coupled receptor 30 intracellular signaling in apoptotic neuronal cells*. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jul 5;392(1-2):90-105. doi: 10.1016/j.mce.2014.05.008.
33. Kajta M, Rzemieniec J, Wnuk A, Lason W. *Triclocarban impairs autophagy in neuronal cells and disrupts estrogen receptor signaling via hypermethylation of specific genes*. *Sci Total Environ*. 2020 Jan 20;701:134818. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134818.
34. Kajta M, Wnuk A, Rzemieniec J, Lason W, Mackowiak M, Chwastek E, Staniszevska M, Nehring I, Wojtowicz AK. *Triclocarban Disrupts the Epigenetic Status of Neuronal Cells and Induces AHR/CAR-Mediated Apoptosis*. *Mol Neurobiol*. 2019 May;56(5):3113-3131. doi: 10.1007/s12035-018-1285-4.

35. Kajta M, Wnuk A, Rzemieniec J, Litwa E, Lason W, Zelek-Molik A, Nalepa I, Rogóż Z, Grochowalski A, Wojtowicz AK. *Depressive-like effect of prenatal exposure to DDT involves global DNA hypomethylation and impairment of GPER1/ESR1 protein levels but not ESR2 and AHR/ARNT signaling.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2017 Jul;171:94-109. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.03.001.
36. Kastenberger I, Schwarzer C. *GPER1 (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner.* Horm Behav. 2014 Sep;66(4):628-36. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.09.001.
37. Kelly JF, Bienias JL, Shah A, Meeke KA, Schneider JA, Soriano E, Bennett DA. *Levels of estrogen receptors alpha and beta in frontal cortex of patients with Alzheimer's disease: relationship to Mini-Mental State Examination scores.* Curr Alzheimer Res. 2008 Feb;5(1):45-51. doi: 10.2174/156720508783884611.
38. Kennedy RC, Menn FM, Healy L, Fecteau KA, Hu P, Bae J, Gee NA, Lasley BL, Zhao L, Chen J. *Early life triclocarban exposure during lactation affects neonate rat survival.* Reprod Sci. 2015 Jan;22(1):75-89. doi: 10.1177/1933719114532844. Epub 2014 May 6. PMID: 24803507; PMCID: PMC4527418.
39. Kimura E, Ding Y, Tohyama C. *AhR signaling activation disrupts migration and dendritic growth of olfactory interneurons in the developing mouse.* Sci Rep. 2016 May 20;6:26386. doi: 10.1038/srep26386.
40. Lan YL, Zhao J, Li S. *Update on the neuroprotective effect of estrogen receptor alpha against Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis. 2015;43(4):1137-48. doi: 10.3233/JAD-141875.
41. Lavecchia A, Di Giovanni C. *Amorfrutins are efficient modulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) with potent antidiabetic and anticancer properties: a patent evaluation of WO2014177593 A1.* Expert Opin Ther Pat. 2015;25(11):1341-7. doi: 10.1517/13543776.2015.1076393.
42. Lebesgue D, Traub M, De Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, Etgen AM. *Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats.* PLoS One. 2010 Jan 8;5(1):e8642. doi: 10.1371/journal.pone.0008642.
43. Lemmen J, Tozakidis IE, Bele P, Galla HJ. *Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation.* Brain Res. 2013 Mar 21;1501:68-80. doi: 10.1016/j.brainres.2013.01.025.
44. Li Y, Xu L, Zeng K, Xu Z, Suo D, Peng L, Ren T, Sun Z, Yang W, Jin X, Yang L. *Propane-2-sulfonic acid octadec-9-enyl-amide, a novel PPAR $\alpha/\gamma$  dual agonist, protects against ischemia-induced brain damage in mice by inhibiting inflammatory responses.* Brain Behav Immun. 2017 Nov;66:289-301. doi: 10.1016/j.bbi.2017.07.015.
45. Liu S, Su M, Song SJ, Hong J, Chung HY, Jung JH. *An Anti-Inflammatory PPAR- $\gamma$  Agonist from the Jellyfish-Derived Fungus Penicillium chrysogenum J08NF-4.* J Nat Prod. 2018 Feb 23;81(2):356-363. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00846.
46. Liu Y, Fang C, Zou P, Ma YN, Han DN, Ji ZH, Liang XF, Guan X, Huang L, Feng T, Wang YT, Liu J, Zou W. *Diverse expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER- $\alpha$ , in hippocampus and cortex of neonatal and adult rats.* Sheng Li Xue Bao. 2013 Jun 25;65(3):263-8.
47. Madak-Erdogan Z, Kim SH, Gong P, Zhao YC, Zhang H, Chambliss KL, Carlson KE, Mayne CG, Shaul PW, Korach KS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues.* Sci Signal. 2016 May 24;9(429):ra53. doi: 10.1126/scisignal.aad8170.
48. Mahboobifard F, Bidari-Zerehpooch F, Davoudi Z, Panahi M, Dargahi L, Pourgholami MH, Sharifi G, Izadi N, Jorjani M. *Expression patterns of ER $\alpha$ 66 and its novel variant isoform ER $\alpha$ 36 in lactotroph pituitary adenomas and associations with clinicopathological characteristics.* Pituitary. 2020 Jun;23(3):232-245. doi: 10.1007/s11102-020-01029-z.
49. Manandhar SR, Basnet R. *Prevalence of Perinatal Asphyxia in Neonates at a Tertiary Care Hospital: A Descriptive Cross-sectional Study.* JNMA J Nepal Med Assoc. 2019 Sep-Oct;57(219):287-292. doi: 10.31729/jnma.4550.
50. Marin R, Ramirez CM, González M, González-Muñoz E, Zorzano A, Camps M, Alonso R, Díaz M. *Voltage-dependent anion channel (VDAC) participates in amyloid beta-induced toxicity and interacts with plasma membrane estrogen receptor alpha in septal and hippocampal neurons.* Mol Membr Biol. 2007 Mar-Apr;24(2):148-60. doi: 10.1080/09687860601055559.

51. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. *Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma*. Eur J Pharmacol. 2016 Aug 15;785:44-49. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.11.004..
52. Mill J, Kiss E, Baji I, Kapornai K, Daróczy G, Vetró A, Kennedy J, Kovacs M, Barr C; *International Consortium for Childhood-Onset Mood Disorders*. Association study of the estrogen receptor alpha gene (ESR1) and childhood-onset mood disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Oct 5;147B(7):1323-6. doi: 10.1002/ajmg.b.30751.
53. Miller DJ, Simpson JR, Silver B. *Safety of thrombolysis in acute ischemic stroke: a review of complications, risk factors, and newer technologies*. Neurohospitalist. 2011 Jul;1(3):138-47. doi: 10.1177/1941875211408731.
54. Mitterling KL, Spencer JL, Dziedzic N, Shenoy S, McCarthy K, Waters EM, McEwen BS, Milner TA. *Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterone receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus*. J Comp Neurol. 2010 Jul 15;518(14):2729-43. doi: 10.1002/cne.22361.
55. Morris GP, Clark IA, Vissel B. *Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol Commun. 2014 Sep 18;2:135. doi: 10.1186/s40478-014-0135-5.
56. Murden S, Borbélyová V, Laštůvka Z, Mysliveček J, Otáhal J, Riljak V. *Gender differences involved in the pathophysiology of the perinatal hypoxic-ischemic damage*. Physiol Res. 2019 Dec 20;68(Suppl 3):S207-S217. doi: 10.33549/physiolres.934356.
57. Murphy SJ, McCullough LD, Smith JM. *Stroke in the female: role of biological sex and estrogen*. ILAR J. 2004;45(2):147-59. doi: 10.1093/ilar.45.2.147.
58. Musiek ES, Holtzman DM. *Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'*. Nat Neurosci. 2015 Jun;18(6):800-6. doi: 10.1038/nn.4018.
59. Nalvarte I, Varshney M, Inzunza J, Gustafsson JÅ. *Estrogen receptor beta and neural development*. Vitam Horm. 2021;116:313-326. doi: 10.1016/bs.vh.2021.02.007.
60. Nissen SE, Wolski K. *Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality*. Arch Intern Med. 2010 Jul 26;170(14):1191-1201. doi: 10.1001/archinternmed.2010.207.
61. Oliviero F, Lukowicz C, Boussadia B, Forner-Piquer I, Pascussi JM, Marchi N, Mselli-Lakhal L. *Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor*. Cells. 2020 Nov 6;9(11):2426. doi: 10.3390/cells9112426. PMID: 33171992.
62. Pei L, Meng S, Yu W, Wang Q, Song F, Ma L. *Inhibition of MicroRNA-383 Ameliorates Injury After Focal Cerebral Ischemia via Targeting PPARγ*. Cell Physiol Biochem. 2016;39(4):1339-46. doi: 10.1159/000447838.
63. Perlman WR, Matsumoto M, Beltaifa S, Hyde TM, Saunders RC, Webster MJ, Rubinow DR, Kleinman JE, Weickert CS. *Expression of estrogen receptor alpha exon-deleted mRNA variants in the human and non-human primate frontal cortex*. Neuroscience. 2005;134(1):81-95. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.055.
64. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. *Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease*. Front Neuroendocrinol. 2009 Jul;30(2):239-58. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.04.015.
65. Prashantha Kumar BR, Kumar AP, Jose JA, Prabitha P, Yuvaraj S, Chipurupalli S, Jeyarani V, Manisha C, Banerjee S, Jeyabalan JB, Mohankumar SK, Dhanabal SP, Justin A. *Minutes of PPAR-γ agonism and neuroprotection*. Neurochem Int. 2020 Nov;140:104814. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104814.
66. Ramos-García NA, Orozco-Ibarra M, Estudillo E, Elizondo G, Gómez Apo E, Chávez Macías LG, Sosa-Ortiz AL, Torres-Ramos MA. *Aryl Hydrocarbon Receptor in Post-Mortem Hippocampus and in Serum from Young, Elder, and Alzheimer's Patients*. Int J Mol Sci. 2020 Mar 14;21(6):1983. doi: 10.3390/ijms21061983.
67. Richardson JR, Levey AI, German DC. *Elevated serum DDE and risk for Alzheimer disease--reply*. JAMA Neurol. 2014 Aug;71(8):1056. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1548.
68. Roque C, Mendes-Oliveira J, Baltazar G. *G protein-coupled estrogen receptor activates cell type-specific signaling pathways in cortical cultures: relevance to the selective loss of astrocytes*. J Neurochem. 2019 Apr;149(1):27-40. doi: 10.1111/jnc.14648.

69. Ryan J, Scali J, Carrière I, Scarabin PY, Ritchie K, Ancelin ML. *Estrogen receptor gene variants are associated with anxiety disorders in older women.* Psychoneuroendocrinology. 2011 Nov;36(10):1582-6. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.04.011.
70. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Kajta M. *Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting ER $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ .* Mol Cell Endocrinol. 2018 Feb 5;461:64-78. doi: 10.1016/j.mce.2017.08.014.
71. Sakr M, Balasundaram P. *Neonatal Therapeutic Hypothermia.* 2022 Sep 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
72. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. *Alzheimer's disease.* Lancet. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
73. Selvaraj UM, Zuurbier KR, Whoolery CW, Plautz EJ, Chambliss KL, Kong X, Zhang S, Kim SH, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mineo C, Shaul PW, Stowe AM. *Selective Nonnuclear Estrogen Receptor Activation Decreases Stroke Severity and Promotes Functional Recovery in Female Mice.* Endocrinology. 2018 Nov 1;159(11):3848-3859. doi: 10.1210/en.2018-00600.
74. Sioen I, Den Hond E, Nelen V, Van de Mierop E, Croes K, Van Larebeke N, Nawrot TS, Schoeters G. *Prenatal exposure to environmental contaminants and behavioural problems at age 7-8years.* Environ Int. 2013 Sep;59:225-31. doi: 10.1016/j.envint.2013.06.014.
75. Slowik A. *New perspectives for acute stroke treatment: the role of mechanical thrombectomy.* Postępy Kardiologii Interwencyjnej. 2014;10(3):145-6. doi: 10.5114/pwki.2014.45138.
76. Stockburger C, Gold VA, Pallas T, Kolesova N, Miano D, Leuner K, Müller WE. *A cell model for the initial phase of sporadic Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis. 2014;42(2):395-411. doi: 10.3233/JAD-140381.
77. Subramaniam SR, Federoff HJ. *Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease.* Front Aging Neurosci. 2017 Jun 8;9:176. doi: 10.3389/fnagi.2017.00176.
78. Sundermann EE, Maki PM, Bishop JR. *A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition.* Menopause. 2010 Jul;17(4):874-86. doi: 10.1097/gme.0b013e3181df4a19.
79. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, Han J. *Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis.* Cancer Med. 2018 Apr;7(4):1070-1080. doi: 10.1002/cam4.1354.
80. Vijverberg Joanna R G V, Lopriore E, Te Pas AB, Rijken M, van Zwet EW, de Bruine FT, Steggerda SJ. *Persistent pulmonary hypertension in neonates with perinatal asphyxia and therapeutic hypothermia: a frequent and perilous combination.* J Matern Fetal Neonatal Med. 2022 Dec;35(25):4969-4975. doi: 10.1080/14767058.2021.1873941.
81. Villapol S. *Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation.* Cell Mol Neurobiol. 2018 Jan;38(1):121-132. doi: 10.1007/s10571-017-0554-5.
82. Viscoli CM, Inzucchi SE, Young LH, Insogna KL, Conwit R, Furie KL, Gorman M, Kelly MA, Lovejoy AM, Kernan WN; IRIS Trial Investigators. *Pioglitazone and Risk for Bone Fracture: Safety Data From a Randomized Clinical Trial.* J Clin Endocrinol Metab. 2017 Mar 1;102(3):914-922. doi: 10.1210/jc.2016-3237.
83. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):703-8. doi: 10.1073/pnas.242735799
84. Wang XS, Yue J, Hu LN, Tian Z, Zhang K, Yang L, Zhang HN, Guo YY, Feng B, Liu HY, Wu YM, Zhao MG, Liu SB. *Activation of G protein-coupled receptor 30 protects neurons by regulating autophagy in astrocytes.* Glia. 2020 Jan;68(1):27-43. doi: 10.1002/glia.23697.
85. Wang YZ, Zhang HY, Liu F, Li L, Deng SM, He ZY. *Association between PPARG genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a northern Chinese Han population: a case-control study.* Neural Regen Res. 2019 Nov;14(11):1986-1993. doi: 10.4103/1673-5374.259621.
86. Warden A, Truitt J, Merriman M, Ponomareva O, Jameson K, Ferguson LB, Mayfield RD, Harris RA. *Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain.* Sci Rep. 2016 Jun 10;6:27618. doi: 10.1038/srep27618.

87. Weidner C, Wowro SJ, Freiwald A, Kawamoto K, Witzke A, Kliem M, Siems K, Müller-Kuhr L, Schroeder FC, Sauer S. *Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist with potent glucose-lowering properties.* Diabetologia. 2013 Aug;56(8):1802-12. doi: 10.1007/s00125-013-2920-2.
88. WHO - World Health Organisation. *Stroke, Cerebrovascular accident.* <https://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.html>
89. Winkler JM, Fox HS. *Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease.* BMC Syst Biol. 2013 Jun 26;7:51. doi: 10.1186/1752-0509-7-51.
90. Wnuk A, Rzemieniec J, Litwa E, Lasoń W, Krzeptowski W, Wójtowicz AK, Kajta M. *The Crucial Involvement of Retinoid X Receptors in DDE Neurotoxicity.* Neurotox Res. 2016 Jan;29(1):155-72. doi: 10.1007/s12640-015-9572-6.
91. Xu XJ, Zeng T, Huang ZX, Xu XF, Lin J, Chen WM. *Synthesis and Biological Evaluation of Cajaninstilbene Acid and Amorfrutins A and B as Inhibitors of the Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing System.* J Nat Prod. 2018 Dec 28;81(12):2621-2629. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00315.
92. Yang Y, Li X, Zhang L, Liu L, Jing G, Cai H. *Ginsenoside Rg1 suppressed inflammation and neuron apoptosis by activating PPAR $\gamma$ /HO-1 in hippocampus in rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury.* Int J Clin Exp Pathol. 2015 Mar 1;8(3):2484-94.
93. Yousufuddin M, Young N. *Aging and ischemic stroke.* Aging (Albany NY). 2019 May 1;11(9):2542-2544. doi: 10.18632/aging.101931.
94. Yue J, Wang XS, Feng B, Hu LN, Yang LK, Lu L, Zhang K, Wang YT, Liu SB. *Activation of G-Protein-Coupled Receptor 30 Protects Neurons against Excitotoxicity through Inhibiting Excessive Autophagy Induced by Glutamate.* ACS Chem Neurosci. 2019 Oct 16;10(10):4227-4236. doi: 10.1021/acchemneuro.9b00287.
95. Yun J, Yeo IJ, Hwang CJ, Choi DY, Im HS, Kim JY, Choi WR, Jung MH, Han SB, Hong JT. *Estrogen deficiency exacerbates  $\beta$ -induced memory impairment through enhancement of neuroinflammation, amyloidogenesis and NF- $\kappa$ B activation in ovariectomized mice.* Brain Behav Immun. 2018 Oct;73:282-293. doi: 10.1016/j.bbi.2018.05.013.
96. Zeng Y, Xie K, Dong H, Zhang H, Wang F, Li Y, Xiong L. *Hyperbaric oxygen preconditioning protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation injury: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Brain Res. 2012 May 3;1452:140-50. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.063.
97. Zhao X, Strong R, Zhang J, Sun G, Tsien JZ, Cui Z, Grotta JC, Aronowski J. *Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia.* J Neurosci. 2009 May 13;29(19):6186-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5857-08.2009.
98. Zhong W, Jin W, Xu S, Wu Y, Luo S, Liang M, Chen L. *Pioglitazone Induces Cardiomyocyte Apoptosis and Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy Via VEGFR-2 Signaling Pathway.* Arq Bras Cardiol. 2018 Aug;111(2):162-169. doi: 10.5935/abc.20180108.
99. Zhong J, Ge HF, Zhang C, Chen JY, Li HH, Fang XY, Tan L, Liu X, Jia ZC, Feng H, Hu R. *G protein-coupled estrogen receptor 1 negatively regulates the proliferation of mouse-derived neural stem/progenitor cells via extracellular signal-regulated kinase pathway.* Brain Res. 2019 Jul 1;1714:158-165. doi: 10.1016/j.brainres.2019.02.024.
100. Zou W, Fang C, Ji X, Liang X, Liu Y, Han C, Huang L, Zhang Q, Li H, Zhang Y, Liu J, Liu J. *Estrogen Receptor (ER)- $\alpha$ 36 Is Involved in Estrogen- and Tamoxifen-Induced Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke Models.* PLoS One. 2015 Oct 20;10(10):e0140660. doi: 10.1371/journal.pone.0140660.
101. Zuo Q, Chen KL, Arredondo Eve A, Liu YJ, Kim SH, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Madak-Erdogan Z. *Pathway Preferential Estrogens Prevent Hepatosteatosis Due to Ovariectomy and High-Fat Diets.* Nutrients. 2021 Sep 23;13(10):3334. doi: 10.3390/nu13103334.

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

### WSPÓŁPRACA ZAGRANICZNA

❖ **prof. Cordian Beyer, Instytut Neuroanatomii, RWTH Aachen University, Niemcy**

okres współpracy: od 2019 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ publikacja: Przepiórska K, **Wnuk A**, Beyer C, Kajta M. *Amorfrutin B Protects Mouse Brain Neurons from Hypoxia/Ischemia by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Processes Through Gene Methylation- and miRNA-Dependent Regulation*. Mol Neurobiol. 2023 Feb;60(2):576-595. doi: 10.1007/s12035-022-03087-9.
- ✓ staż naukowy w Instytucie Neuroanatomii Universitätsklinikum RWTH w Akwizgranie (lipiec/sierpień 2019)

❖ **prof. Inna Gaisler-Salomon, Uniwersytet w Haifie, Izrael**

okres współpracy: od 2017 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ pierwszoautorska publikacja: Zaidan H, **Wnuk A**, Aderka IM, Kajta M, Gaisler-Salomon I, *Pre-reproductive stress in adolescent female rats alters maternal care and DNA methylation patterns across generations*. Publikacja po pozytywnych recenzjach w czasopiśmie *Stress*

### WSPÓŁPRACA KRAJOWA

❖ **prof. dr hab. Joanna Śliwowska, Pracownia Neurobiologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

okres współpracy: od 2022 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ prowadzone badania dotyczą wpływu diety kafeteryjnej na procesy neurorozwojowe i neurodegeneracyjne



❖ **dr hab. Małgorzata Lenartowicz, prof. UJ, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

okres współpracy: od 2022 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ prowadzone badania dotyczą wpływu delekcji genu *p53* na szlak sygnałowy związany z receptorami estrogenowymi

❖ **prof. dr hab. Elżbieta Salińska, Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN w Warszawie**

okres współpracy: od 2019 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ publikacja: Rzemieniec J, Bratek E, **Wnuk A**, Przepiórska K, Salińska E, Kajta M. *Neuroprotective effect of 3,3'-Diindolylmethane against perinatal asphyxia involves inhibition of the AhR and NMDA signaling and hypermethylation of specific genes.* Apoptosis. 2020 Oct;25(9-10):747-762. doi: 10.1007/s10495-020-01631-3.

❖ **prof. dr hab. Anna K. Wójtowicz, dr hab. Konrad Szychowski, Katedra Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie**

okres współpracy: od 2016 roku – obecnie

wyniki współpracy:

- ✓ publikacja: Wójtowicz AK; Sitarz-Głownia AM; **Wnuk A**; Kajta M; Szychowski KA. *Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Ppar $\gamma$ ) and matrix metalloproteinases-2 and -9 (Mmp-2 and -9) in the mechanism of action of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in cultured mouse brain astrocytes and neurons.* Publikacja po pozytywnych recenzjach w czasopiśmie *Toxicology In Vitro*
- ✓ publikacja: Szychowski KA, **Wnuk A**, Rzemieniec J, Kajta M, Leszczyńska T, Wójtowicz AK. *Triclosan-Evoked Neurotoxicity Involves NMDAR Subunits with the Specific Role of GluN2A in Caspase-3-Dependent Apoptosis.* Mol Neurobiol. 2019 Jan;56(1):1-12. doi: 10.1007/s12035-018-1083-z.

- ✓ publikacja: Wójtowicz AK, Szychowski KA, **Wnuk A**, Kajta M. *Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ERα), Estrogen Receptor Beta (ERβ), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARγ) in Mouse Cortical Neurons*. Neurotox Res. 2017 Jan;31(1):77-89. doi: 10.1007/s12640-016-9665-x.
- ✓ publikacja: Szychowski KA, **Wnuk A**, Kajta M, Wójtowicz AK. *Triclosan activates aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent apoptosis and affects Cyp1a1 and Cyp1b1 expression in mouse neocortical neurons*. Environ Res. 2016 Nov;151:106-114. doi: 10.1016/j.envres.2016.07.019.
  
- ❖ **prof. dr hab. Krystyna Gołębiewska, dr Karolina Noworyta, Zespół II, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**  
okres współpracy: 2018-2020  
wyniki współpracy:
  - ✓ publikacja: Kamińska K, Noworyta-Sokołowska K, Górską A, Rzemieniec J, **Wnuk A**, Wojtas A, Kreiner G, Kajta M, Gołębiewska K. *The Effects of Exposure to Mephedrone During Adolescence on Brain Neurotransmission and Neurotoxicity in Adult Rats*. Neurotox Res. 2018 Oct;34(3):525-537. doi:10.1007/s12640-018-9908-0.
  - ✓ publikacja: Noworyta-Sokołowska K, Kamińska K, Rzemieniec J, **Wnuk A**, Wojcieszak J, Górską AM, Kreiner G, Kajta M, Gołębiewska K. *Effects of exposure to 5-MeO-DIPT during adolescence on brain neurotransmission and neurotoxicity in adult rats*. Forensic Toxicol. 2019;37(1):45-58. doi: 10.1007/s11419-018-0433-x.
  
- ❖ **dr hab. Elżbieta Lorenc-Koci, Zakład Neuropsychofarmakologii, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**  
okres współpracy: 2018-2019  
wyniki współpracy:
  - ✓ publikacja: Górny M, **Wnuk A**, Kamińska A, Kamińska K, Chwatko G, Bilska-Wilkosz A, Iciek M, Kajta M, Rogóż Z, Lorenc-Koci E. *Glutathione Deficiency and Alterations in the Sulfur Amino Acid Homeostasis during Early Postnatal Development as Potential Triggering Factors for Schizophrenia-Like Behavior in Adult Rats*. Molecules. 2019 Nov 22;24(23):4253. doi: 10.3390/molecules24234253.

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

### Działalność dydaktyczna

- ❖ Promotor pracy magisterskiej inż. Andrzeja Łacha, studenta kierunku Bioinżynieria, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (czerwiec 2021 - czerwiec 2022). Tytuł pracy: *Mechanizmy działania chemicznego filtra UV, benzofenonu-3, w mózgu myszy*. Obrona pracy magisterskiej miała miejsce na Uniwersytecie Rolniczym im. Hugona Kołłątaja w Krakowie 14 lipca 2021 r.
- ❖ Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim mgr Bernadety Pietrzak, doktorantki Krakowskiej Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej w IF PAN (2021-obecnie). Tytuł rozprawy doktorskiej: *Neuroprotektoryjne znaczenie nowych ligandów receptorów steroidowych oraz receptorów dla ksenobiotyków w ochronie komórek nerwowych mózgu ssaków przed neurodegeneracjami*. Termin obrony pracy doktorskiej przewidziany jest na IV kwartał 2025 r.
- ❖ Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim mgr Karoliny Przepiórskiej, doktorantki Krakowskiej Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej w IF PAN (2019 - obecnie). Tytuł rozprawy doktorskiej: *Znaczenie nowych ligandów receptora PPAR $\gamma$  w ochronie komórek nerwowych mózgu ssaków przed niedotlenieniem i niedokrwieniem*. Termin obrony pracy doktorskiej przewidziany jest na IV kwartał 2023 r.
- ❖ Opiekun naukowy lic. Bernadety Pietrzak, magistrantki IF PAN (październik 2019 - czerwiec 2021).
- ❖ Organizator stażu naukowego doktorantki z zagranicy w ramach „Międzynarodowej wymiany stypendialnej kadry akademickiej i doktorantów PROM”  
– mgr Clara Voelz, RWTH Aachen, Niemcy (wrzesień 2019).
- ❖ Organizator stażu naukowego doktorantki z zagranicy w ramach „Międzynarodowej wymiany stypendialnej kadry akademickiej i doktorantów PROM”  
– mgr Natalie Gasterich, RWTH Aachen, Niemcy (wrzesień 2019).
- ❖ Opiekun naukowy stażystki lic. Bernadety Pietrzak (czerwiec - wrzesień 2019).

- ❖ Koordynator Journal Club, spotkań organizowanych przez Dyрекcję IF PAN w Krakowie, przeznaczonych dla doktorantów i młodych naukowców, podczas których omawiane i dyskutowane są najnowsze artykuły z prestiżowych czasopism naukowych (od 2017 roku do obecnie).

### Udział w wydarzeniach popularyzujących naukę

- ❖ Wykład i warsztaty podczas Małopolskiej Nocy Naukowców „*Kilka słów o toksycznych związkach, czyli mózg kontra toksyny*” Kraków, 24 września 2021
- ❖ Wykład wygłoszony podczas XIX edycji Festiwalu Nauki i Sztuki w Krakowie “*Krem przeciwsłoneczny z filtrem UV. Popularny, ale czy dobry dla naszego mózgu?*” Kraków, 16 maja 2019.
- ❖ Wywiad dla Forum Akademickiego (12/2018) pt. „*Popularne nie znaczy dobre*”.
- ❖ Referaty i warsztaty wygłoszone podczas XVII edycji Festiwalu Nauki i Sztuki w Krakowie „*Udar na szalce, czyli jak brokoły chronią komórki nerwowe przed niedotlenieniem*”, „*Mózg i środowisko – toksyczny związek?*” Kraków, 25–27 maja 2017.
- ❖ Wykład wygłoszony podczas XVIII edycji Festiwalu Nauki i Sztuki w Krakowie “*Efekty działania najczęściej stosowanego filtra przeciwsłonecznego, benzofenonu-3 na komórki nerwowe myszy*” Kraków, 17 maja 2018.

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

### Pozyskiwanie funduszy na działalność naukową

- ❖ **Kierownik projektu badawczego SONATA 17** finansowanego przez NCN nr 2021/43/D/NZ7/00633 - *Nowa, pourazowa strategia leczenia udaru i asfiksji okołoporodowej - nowatorskie podejście terapeutyczne oparte na selektywnej aktywacji błonowych receptorów estrogenowych mER $\alpha$  i mER $\beta$ .*

- ❖ **Kierownik projektu badawczego PRELUDIUM 7** finansowanego przez NCN 2014/13/N/NZ4/04845 - *Neurotoksyczne działanie benzofenonu-3: znaczenie receptorów estrogenowych oraz receptora retinoidowego X alfa.*

### Nagrody i wyróżnienia

- ❖ **2 Nagrody Dyrektora IF PAN** za autorstwo w publikacjach o wysokim współczynniku wpływu za rok 2021 (marzec 2022)

WNUK A, Rzemieniec J, Przepiórska K, Pietrzak BA, Maćkowiak M, Kajta M. *Prenatal Exposure to Triclocarban Impairs ESRI Signaling and Disrupts Epigenetic Status in Sex-Specific Ways as Well as Dysregulates the Expression of Neurogenesis- and Neurotransmitter-Related Genes in the Postnatal Mouse Brain.* Int J Mol Sci. 2021 Dec 4;22(23):13121. doi: 10.3390/ijms222313121.

WNUK A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. *Post-Treatment with Amorfrutin B Evokes PPAR $\gamma$ -Mediated Neuroprotection against Hypoxia and Ischemia.* Biomedicines. 2021 Jul 21;9(8):854. doi: 10.3390/biomedicines9080854.

- ❖ **Wyróżnienie Rady Naukowej i Dyrekcji Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk** w uznaniu osiągnięć naukowych i zajęcie 3 miejsca w grupie Asystentów w wyniku prowadzonej oceny kadry naukowej w IF PAN w latach 2016-2019 (maj 2021)

- ❖ **2 Nagrody Dyrektora IF PAN** za autorstwo i współautorstwo w publikacjach o wysokim współczynniku wpływu za rok 2020 (luty 2021)

WNUK A., RZEMIENIEC J., PRZEPIÓRSKA K., WESOŁOWSKA J., Wójtowicz A.K., KAJTA M.: *Autophagy-related neurotoxicity is mediated via AHR and CAR in mouse neurons exposed to DDE.* Science of the Total Environment, 2020, 742, 140599.

KAJTA M., RZEMIENIEC J., WNUK A., LASOŃ W.: *Triclocarban impairs autophagy in neuronal cells and disrupts estrogen receptor signaling via hypermethylation of specific genes.* Science of the Total Environment, 2020, 701, 134818.

- ❖ **Laureatka Zespołowej Nagrody Naukowej Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk** za cykl publikacji pt. *Identyfikacja nowych mechanizmów molekularnych angażujących receptory estrogenowe i receptory dla ksenobiotyków w neuroprotekcję i neurotoksyczność*. (listopad 2018)
  
- ❖ **Laureatka stypendium START 2018** – organizator Fundacja na rzecz Nauki Polskiej (maj 2018)
  
- ❖ **Laureatka stypendium wyjazdowego START 2018** - organizator Fundacja na rzecz Nauki Polskiej (maj 2018) - 3 tygodniowy pobyt szkoleniowy w Instytucie Neuroanatomii Universitätsklinikum RWTH w Akwizgranie
  
- ❖ **2 Nagrody Dyrektora IF PAN** za autorstwo w publikacjach o wysokim współczynniku wpływu za rok 2018 (maj 2019)

WNUK A., RZEMIENIEC J., LASOŃ W., Krzeptowski W., KAJTA M. *Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells*. Mol Neurobiol. 2018 Jun;55(6):5059-5074. doi: 10.1007/s12035-017-0704-2.

WNUK A., RZEMIENIEC J., LASOŃ W., Krzeptowski W., KAJTA M. *Apoptosis induced by the UV filter benzophenone-3 in mouse neuronal cells is mediated via attenuation of Era/Ppar $\gamma$  and stimulation of Erb $\beta$ /Gpr30 signaling*. Mol Neurobiol. 2018 Mar;55(3):2362-2383. doi: 10.1007/s12035-017-0480-z.

## Dorobek naukowy – wyciąg bibliometryczny

Dane na dzień 21.02.2023 r.

Liczba publikacji w czasopismach posiadających Impact Factor (baza Journal Citation Reports) oraz sumaryczny Impact Factor dla prac pełnotekstowych\*

Lp.	Wskaźniki bibliometryczne
1	Liczba prac w czasopismach z IF: 31
2	Sumaryczny IF: 138,43
3	Punkty MNiSW: 2310

Liczba publikacji, liczba cytowań oraz indeks Hirscha w bazie Web of Science Core Collection oraz bazie Scopus

L.p.	Wskaźniki bibliometryczne	Web of Science <sup>1</sup> (Core Collection)	Scopus <sup>2</sup>
1.	Łączna liczba rekordów	38	31
2.	Liczba cytowań z autocytowaniami	654	676
3.	Indeks Hirscha	18	18
4.	Liczba cytowań bez autocytowań	497	519

\*Przy obliczaniu sumarycznego wskaźnika Impact Factor nie są brane pod uwagę następujące typy publikacji: streszczenia, listy, appendix, editorial i erraty

\* Impact Factor (IF) - wartość wskaźnika IF podana jest wg zasady: rok publikacji zgodny z rokiem edycji bazy Journal Citation Reports (JCR). Ponieważ wskaźniki IF publikowane są w połowie roku następnego za rok którego dotyczą, zatem w sytuacji, gdy w momencie sporządzania wyciągu bibliometrycznego nie ma dostępnego odpowiedniego dla roku opublikowania pracy wskaźnika, takiej pracy przypisuje się ostatnią dostępną w bazie JCR wartość IF.

\*\* W bazie WoS nie ma możliwości wykluczenia autocytowań

<sup>1</sup>Articles - 28, Review – 2, Meeting Abstract – 7, Correction – 1, Early Access - 1

<sup>2</sup>Articles - 29, Review - 1, Erratum – 1

.....  
(podpis wnioskodawcy)