



Autoreferat

dr Agnieszka Wąsik

**Zakład Neurochemii
Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk
W Krakowie**

Spis treści:

1. Dane osobowe.....	3
1.1 Imię i nazwisko.....	3
1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	3
1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
2. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	4
2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.....	4
2.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
2.3 Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).....	34
3.1 Inne realizowane tematy badawcze.....	34
3.2 Prace przeglądowe.....	40

1. Dane osobowe

1.1 Imię i Nazwisko

Agnieszka Wąsik

1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Mgr biologii – Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Krakowie, Wydział Geograficzno-Biologiczny

20.06.1994 – obrona pracy magisterskiej pt. " Wpływ serotoniny na behavior *Paramecium aurelia* po zablokowaniu kanałów wapniowych" wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii, i uzyskanie stopnia magistra biologii

Promotor: prof. dr hab. Ryszard Pado

Recenzenci: prof. dr hab. Henryk Lach

prof. dr hab. Wiesław Stawiński

Dr n. med. – Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

27.11.2007 – obrona pracy doktorskiej pt. " Przeciwwzależnieniowy potencjał endogennej substancji 1-metylo -1,2,3,4- tetrahydroizochinoliny oceniany eksperymentalnie w badaniach behawioralnych i neurochemicznych" i uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych, specjalność: biologia medyczna, z wyróżnieniem.

Promotor: prof. dr hab. Lucyna Antkiewicz-Michaluk

Recenzenci: prof. dr hab. Sylwia Fidecka

Prof. dr hab. Jan Braszko

1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1994 – 2003 nauczyciel biologii w VI Liceum Ogólnokształcącym
im. J. Korczaka w Sosnowcu

2003 – 2007 doktorant w ramach Studium Doktoranckiego,
Zakład Biochemii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

2007 – 2010	asystent w Zakładzie Neurochemii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie
2010 – do chwili obecnej	adiunkt w Zakładzie Neurochemii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

- 2. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Osiągnięciem naukowym poddanym ocenie jest cykl siedmiu prac opublikowanych w latach 2009-2016 i dotyczących **Behawioralnej, biochemicznej i molekularnej analizy procesów związanych z neurotoksycznością i neuroprotekcją w oparciu o mechanizm działania endogennych amin z grupy tetrahydroizochinoliny; w celu poszukiwania nowych, skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków.**

2.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- 1. Agnieszka Wąsik, Irena Romańska, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous parkinsonism-inducing toxin, strongly potentiates MAO-dependent dopamine oxidation and impairs dopamine release: ex vivo and in vivo neurochemical studies. (2009) *Neurotoxicity Research* Jan;15(1):15-23 (IF: 2.439; MNiSW: 24)**
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1,2,3,4; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%
- 2. Agnieszka Wąsik, Irena Romańska, Jerzy Michaluk, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. Comparative behavioral and neurochemical studies of R- and S-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline stereoisomers in the rat. (2012) *Pharmacol Rep* 64(4): 857-869 (IF: 1.965; MNiSW: 25)**
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji

stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,2a,2b,2c,2d; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%

3. **Agnieszka Wąsik**, Edyta Możdżeń, Irena Romańska, Jerzy Michaluk, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. Antidepressant-like activity of the endogenous amine, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the behavioral despair test in the rat, and its neurochemical correlates: a comparison with the classical antidepressant, imipramine. (2013) *Eur J Pharmacol* Jan 30;700(1-3):110-7 (IF: 2.684; MNiSW: 30)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; interpretacji wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,1c,2,3a,3b,3c,3d,4,5; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%

4. **Agnieszka Wąsik**, Małgorzata Kajta, Tomasz Lenda & Lucyna Antkiewicz-Michaluk. Concentration-Dependent Opposite Effects of 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on Markers of Apoptosis: In Vitro and Ex Vivo Studies. (2014) *Neurotoxicity Research* volume 25 number 1, 90-99 (IF: 3.538 ; MNiSW: 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; narysowaniu rycin 1,2,3,5,6,7; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 45%

5. **Agnieszka Wąsik**, Irena Romańska¹, Jerzy Michaluk¹, Małgorzata Kajta², Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an Endogenous Neurotoxic Compound, Disturbs the Behavioral and Biochemical Effects of l-DOPA: In Vivo and Ex Vivo Studies in the Rat. (2014) *Neurotoxicity Research* volume 26 number 3, 240-254 (IF: 3.538; MNiSW: 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,2a,2b,3,4a,4b,5a,5b; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%

6. **Agnieszka Wąsik**, Edyta Możdżeń, Jerzy Michaluk, Irena Romańska, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous

Neuroprotectant and MAO inhibitor with antidepressant-like properties in the rat. **(2014)** *Neurotoxicity Research* volume 25 number 4, 323-334 **(IF: 3.538; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; interpretacji wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,1c,2,3a,3b,3c,4,5; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%

7. **Agnieszka Wąsik¹, Dawid Polak², Irena Romańska¹, Jerzy Michaluk¹, Lucyna Antkiewicz-Michaluk¹**. The impact of 1MeTIQ on the function of dopaminergic system in 6-OHDA model of Parkinson's disease. **(2016)** *Pharmacological Rep*, Dec 13;68(6):1205-1213. doi: 10.1016/j.pharep.2016.08.004 **(IF: 2.251; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu wykonania lezji 6-OHDA; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu ryciny 1; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%

2.3 Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. Wprowadzenie

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera (AD) czy choroba Parkinsona (PD) stanowią coraz większy procent wszystkich chorób w państwach wysoko uprzemysłowionych. Jest to związane z jednej strony z wydłużonym czasem życia populacji (a co za tym idzie ze starzeniem się tych społeczeństw) z drugiej strony z silnym zanieczyszczeniem środowiska. Badania nad chorobami neurodegeneracyjnymi są prowadzone od wielu lat w szeregu ośrodkach naukowych i skupiają się na dwóch podstawowych aspektach. Po pierwsze na etiologii tych chorób, ustaleniu jakie są czynniki ryzyka wpływające na rozwój danej choroby. Po drugie, na poszukiwaniu leków/mechanizmów neuroprotekcyjnych pozwalających na zatrzymanie rozwoju choroby i poprawy stanu zdrowia pacjentów, a więc na działaniu na przyczynę tych zmian, a nie tylko łagodzeniu objawów choroby. W naszym Zakładzie Neurochemii od wielu lat są prowadzone prace nad właściwościami i mechanizmem działania związków z grupy tetrahydroizochinolin

(TIQs). Tetrahydroizochinoliny to endogenne aminy występujące naturalnie w roślinach oraz produktach żywnościowych bogatych w 2-fenyletyloaminę, takich jak: ser, mleko, czerwone wino czy banany [Makino i wsp. 1988; Niwa i wsp. 1989]. Ponadto, związki te wykryto także w mózgu ssaków (gryzoni i małp) oraz w mózgu człowieka [Kohno i wsp. 1986; Makino i wsp. 1988; Niwa i wsp. 1987, 1989; Ohta i wsp. 1987; Yamakawa i wsp. 1999]. Po iniekcjach obwodowych tetrahydroizochinoliny łatwo przechodzą przez barierę krew-mózg i akumulują się w mózgu [Kikuchi i wsp. 1991]. U ssaków tetrahydroizochinoliny powstają w wyniku nieenzymatycznej reakcji kondensacji amin biogennych (dopaminy, fenyletyloaminy) z aldehydami lub α -ketokwasami [McNaught i wsp. 1998; Nagatsu 1997; Rommelspacher i Susilo 1985]. Według Nagatsu [1997] i Yamakawa i wsp. [1999] związki te mogą być również syntetyzowane na drodze enzymatycznej. Główną drogą eliminacji TIQs z organizmu ssaków jest reakcja 4-hydroksylacji zachodząca w wątrobie przy udziale izoenzymów cytochromu P-450 należących do podrodziny CYP2D [Suzuki i wsp. 1992]. Zainteresowanie tetrahydroizochinolinami pojawiło się pod koniec lat 80-tych, ponieważ ich struktura chemiczna bardzo przypominała budowę znanej egzotoksyny 1-metylo-1-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP). MPTP wykazuje silne działanie neurotoksyczne po przekształceniu w jon MPP^+ , a reakcja ta jest katalizowana przez enzym monoaminooksydazę typu B (MAO_B). Podobnie tetrahydroizochinoliny mają zdolność tworzenia jonu izochinolinowego analogicznego do MPP^+ [Maruyama i wsp. 1997; Naoi i wsp. 1994, 1989a, b] i w badaniach eksperymentalnych wykazano, że niektóre z nich mogą wywoływać parkinsonizm polekowy u małp [Nagatsu i Yoshida 1988] oraz u szczurów [Naoi i wsp. 1996]. Jednakże w przeciwieństwie do MPTP, które już po jednorazowej dawce wywołuje szybkie i nieodwracalne uszkodzenia w nigrostriatalnym systemie dopaminowym [Burns i wsp. 1985], tetrahydroizochinoliny wywołują znacznie słabsze i oddalone w czasie neurotoksyczne efekty dopiero po wielokrotnych iniekcjach [Nagatsu i Yoshida 1988]. Dlatego uznano, że TIQs mogą być endogennymi czynnikami ryzyka w etiopatologii choroby Parkinsona. Ciekawostką jest, że wśród tetrahydroizochinolin znajdują się zarówno związki o dużej neurotoksyczności (takie jak 1BnTIQ) [Wąsik i wsp. 2009; 2014; 2016] jak i związki wykazujące właściwości ochronne (takie jak 1MeTIQ) [Abe i wsp. 2005; Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2003, 2004, 2006]. Większość badanych TIQs wykazuje właściwości antydopaminowe z atypowym mechanizmem działania związanym z powinowactwem tych związków głównie do aktywnej konformacji receptorów dopaminowych [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2000; Vetulani i wsp. 2003]. Dlatego związki te bardzo efektywnie blokują działanie agonistów receptorów dopaminowych takich jak apomorfina czy amfetamina [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001]. Wydaje się, że niektóre tetrahydroizochinoliny odgrywają ważną rolę jako

naturalne czynniki antydopaminowe, które mogą kontrolować nadmierną aktywność/pobudzenie układu dopaminowego [Vetulani i wsp. 2003], a co istotniejsze w przeciwieństwie do typowych neuroleptyków nie wywołują katalepsji u zwierząt [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2000].

Podstawowym założeniem mojej pracy habilitacyjnej są porównawcze badania efektów oddziaływania endogennych amin z grupy tetrahydroizochinolin na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) analizowanych w testach behawioralnych, biochemicznych oraz molekularnych. Prowadzona praca habilitacyjna jest kontynuacją i poszerzeniem badań prowadzonych w Zakładzie Neurochemii IF PAN od kilkunastu lat.

W pracy habilitacyjnej skupiłam się w szczególności na dwóch endogennych pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (TIQ):

- 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina (1BnTIQ)
- 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina (1MeTIQ)

Aminy te są szczególnie interesujące ze względu na ich przeciwstawny mechanizm działania na OUN ssaków.

II. Neurotoksyczny mechanizm działania endogennej aminy, 1BnTIQ w OUN szczura

1BnTIQ może być enzymatycznie syntetyzowany w mózgu ssaków z fenyloetyloaminy (PEA) przy udziale enzymu MAO_B lub dostawać się do organizmu razem z pokarmem, by następnie być wychwytywany przez neurony dopaminowe za pomocą transportera dopaminowego (DAT) [Okada i wsp. 1998]. Związek ten gromadzi się w neuronach dopaminowych wykazując szkodliwe działanie wywołujące parkinsonizm polekowy [Nagatsu i Yoshida 1988; Naoi i wsp. 1996]. Jak wykazaliśmy w naszych badaniach, finansowanych z grantu **MNiSzW 0048/B/P01/2009/36** (w którym byłam głównym wykonawcą) 1BnTIQ jest związkiem o neurotoksycznym charakterze oddziaływania. W badaniach biochemicznych *ex vivo* wykonanych metodą chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC z ED), 1BnTIQ wykazuje wyraźnie negatywne działanie na układ dopaminowy mózgu. Po jednorazowym podaniu związku obserwujemy znamienne spadki poziomu dopaminy w strukturach szlaku czarno-prążkowiego mózgu szczura. Jednocześnie zmianom tym towarzyszą istotne wzrosty poziomów metabolitów dopaminy: wewnątrzneuronalnego, DOPAC i całkowitego, HVA. Obserwowane zmiany w poziomach metabolitów są dodatnio skorelowane ze wzrostami szybkości metabolizmu dopaminy (DA) zarówno szlaku jej oksydacji (mierzonego jako indeks [DOPAC]/[DA]) jak i całkowitego metabolizmu ([HVA]/[DA]). Przedstawiony profil działania 1BnTIQ prowadzi do silnych wzrostów produkcji wolnych

rodników (w tym najgroźniejszego rodnika hydroksylowego), co w efekcie skutkuje uszkodzeniem neuronów dopaminowych i w konsekwencji prowadzi do ich śmierci na drodze apoptozy [1, 4]. Ponadto wykazaliśmy, że wielokrotne podania 1BnTIQ prowadzą do rozwoju tolerancji na jego uszkadzające struktury dopaminowe efekty. Jakkolwiek, nadal obserwowano istotne nasilenie metabolizmu dopaminy szczególnie jej ścieżki oksydacyjnej [1]. Jak sugerowały nasze badania, a także badania innych autorów, 1BnTIQ mógłby być jednym z endogennych czynników biorących udział w etiopatogenezie choroby Parkinsona (PD). Szukając odpowiedzi na tak postawione pytanie zastosowaliśmy chroniczne podania 1BnTIQ w celu modelowania tej choroby na zwierzętach. 1BnTIQ, wydaje się być odpowiednią do tego celu substancją albowiem w przeciwieństwie do wielu egzogennych toksyn (6-OHDA, czy MPTP) nie wywołuje natychmiastowych neurodegeneracji, a raczej progresywne zmiany w strukturach i funkcjonowaniu neuronów dopaminowych co dobrze naśladuje wczesne etapy choroby Parkinsona. W celu lepszego wglądu w mechanizm oddziaływania 1BnTIQ na aktywność neuronów dopaminowych, w tym szczególnie w proces uwalniania dopaminy wykonaliśmy eksperymenty *in vivo* metodą mikrodializy prążkowiej u swobodnie poruszającego się szczura. Metoda ta jest bardzo cenna gdyż pozwala na bieżąco monitorować zmiany w uwalnianiu neuroprzekaźnika do przestrzeni pozakomórkowej i jednocześnie obserwować zachowanie badanego zwierzęcia. Z przeprowadzonych przez nas eksperymentów wynika, że jednorazowe podanie 1BnTIQ powoduje nieznaczny spadek uwalniania dopaminy w prążkowie, natomiast wielokrotne podanie prowadzi do znacznego wzrostu (ok. 300%) stężenia zewnątrzneuronalnej dopaminy [1]. Charakter tych zmian sugeruje uszkodzenie funkcji transportera dopęcherzykowego (VMAT2) przez 1BnTIQ co w efekcie prowadzi do zaburzenia procesu magazynowania dopaminy w pęcherzykach synaptycznych. 1BnTIQ podobnie jak rezerpina (specyficzny inhibitor dopęcherzykowego transportera wychwytu monoamin), wywołuje obniżenie poziomu dopaminy w prążkowie szczura ponieważ zsyntetyzowana dopamina nie jest prawidłowo zmagazynowana w pęcherzykach synaptycznych. Dysfunkcja neuronów dopaminowych koreluje z transportem podstawowym oraz mechanizmami przechowywania neuroprzekaźników (wychwytem neuronalnym [DAT] oraz wychwytem dopęcherzykowym [VMAT2]). Powyższe wyniki sugerują, że 1BnTIQ może uszkadzać VMAT2 w neuronach dopaminowych, co w efekcie prowadzi do patologicznego wzrostu stężenia dopaminy w cytozolu i nasilenia jej katabolizmu na drodze oksydacji przy udziale MAO co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników, a zwłaszcza szczególnie niebezpiecznego dla funkcji komórki nerwowej rodnika hydroksylowego. Takie działanie 1BnTIQ naśladuje w pewnym stopniu zwiększony obrót dopaminy w zakończeniach dopaminergicznych obserwowany w chorobie Parkinsona [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001]. W kolejnym etapie naszych badań sprawdziliśmy wpływ 1BnTIQ na markery apoptozy (aktywność kaspazy-3, spadek potencjału

błonowego, poziom uwalniania LDH, śmiertelność komórek oraz tworzenie ciał apoptotycznych) w komórkach hipokampa za pomocą techniki *in vitro* [4]. Eksperymenty *in vitro* doprowadziły do ciekawych konkluzji związanych z mechanizmem działania 1BnTIQ wskazujących na jego dwukierunkowe, przeciwstawne efekty zależne od zastosowanego stężenia. I tak w niskich stężeniach [50 μ M], stwierdzono neuroprotektoryjne działanie 1BnTIQ, podczas gdy w wysokich [500 μ M] wykazano działanie neurotoksyczne. To toksyczne działanie 1BnTIQ polegało na znamienym nasileniu toksycznych efektów wywołanych przez glutaminian [1mM] tj. zwiększeniu aktywności kaspazy-3 oraz zwiększeniu uwalniania LDH. Mierząc ilość ciał apoptotycznych w kulturach hipokampa szczura za pomocą barwienia Hoechst 33342 oraz kalceiny AM otrzymaliśmy podobne wyniki tzn. 1BnTIQ w niskim stężeniu [50 μ M] częściowo hamował natomiast w wysokim stężeniu [500 μ M] nasilał pro-apoptotyczne efekty glutaminianu [4]. Inni autorzy w badaniach *in vitro* wykonanych na linii komórkowej SH-SY5Y wykazali, że 1BnTIQ nawet w niskich stężeniach [1 - 100 μ M] indukuje śmierć komórek nasilając proces apoptozy. Związek ten podnosi poziom pro-apoptotycznego białka Bax a jednocześnie obniża poziom anty-apoptotycznego białka Bcl-xl [Shavali i Ebadi 2003]. Ponadto wykazano, że 1BnTIQ w niskim stężeniu redukuje poziom glutationu oraz podnosi poziom białka α -synukleiny a wysokie stężenie 1BnTIQ znamienne podnosi poziom wolnych rodników oraz obniża poziom ATP w komórkach SH-SY5Y [Shavali i wsp. 2004]. Trzeba zwrócić uwagę, że w naszych badaniach 1BnTIQ uszkodził komórki hipokampa, który jest strukturą zawierającą różne typy neuronów, w tym dużą ilość neuronów glutaminergicznych a tylko niewielką część stanowią neurony dopaminowe. Tymczasem pozostali autorzy prowadzili swe eksperymenty na czystych liniach ludzkich komórek dopaminowych SH-SY5Y i stąd mogą wynikać rozbieżności w sile toksycznego działania 1BnTIQ. Z kolei w badaniach *ex vivo* wykazaliśmy, że chroniczne iniekcje 1BnTIQ [50 mg/kg i.p.] prowadzą do zwiększenia aktywności kaspazy-3 w hipokampie szczura. W tym samym eksperymencie nie udało się jednak uzyskać znamienych zmian w poziomie α -synukleiny i hydroksylazy tyrozynowej (TH) [4]. Obserwowane efekty mogą być związane zarówno ze słabą toksycznością 1BnTIQ jak i z mechanizmami kompensacyjnymi zachodzącymi w mózgu takimi jak wzrost ekspresji TH w pozostałych żywych komórkach hipokampa.

W ostatnim etapie badań wykorzystaliśmy chroniczne podania 1BnTIQ (25 i 50 mg/kg i.p.) jako model choroby Parkinsona, w którym badaliśmy behawioralne i biochemiczne efekty L-DOPA (100 mg/kg i.p.), złotego standardu terapeutycznego stosowanego u pacjentów z tą neurodegeneracyjną chorobą [5]. Jak wiadomo L-DOPA jest bezpośrednim prekursorem dopaminy, i jest stosowana w leczeniu objawowym PD w celu zwiększenia produkcji tego neuroprzekaźnika w mózgu. Jednocześnie zwiększone stężenie L-DOPA wywołuje szereg niekorzystnych zjawisk takich jak zwiększenie stresu oksydacyjnego poprzez potęgowanie auto-oksydacji, formowanie wolnych rodników czy

zmniejszenie poziomu glutationu w prążkowie [Ogawa i wsp. 1994; Spencer i wsp. 1996; Hattoria i wsp. 2009]. Ponadto wykazano, że L-DOPA indukuje apoptozę poprzez zwiększenie aktywności kaspazy-3 oraz uszkodzenie DNA [Pedrosa i Soares-da-Silva 2002; Tanaka i Ogawa 2005; Emdadul Haque i wsp. 2003]. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że chroniczne podania 1BnTIQ antagonizują zarówno behawioralne jak i biochemiczne efekty L-DOPA. Podczas pomiaru aktywności lokomotorycznej zaobserwowano, że chroniczne iniekcje 1BnTIQ całkowicie antagonizują hiperaktywność indukowaną przez L-DOPA. Natomiast eksperymenty *ex vivo* wykazały, że chroniczne iniekcje 1BnTIQ częściowo blokują biochemiczne efekty L-DOPA w prążkowie i istocie czarnej [5]. Podobnie w badaniach *in vivo* wykonanych metodą mikrodializy, wielokrotne dawki 1BnTIQ osłabiają indukowany przez L-DOPA wzrost uwalniania dopaminy do przestrzeni pozakomórkowej prążkowie szczura. W świetle otrzymanych przez nas wyników, a także badań innych autorów [Kotake i wsp. 1995] wskazujących na wielokrotne podniesienie stężenia 1BnTIQ w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z chorobą Parkinsona, terapeutyczny efekt L-DOPA u tych pacjentów może być znacznie osłabiony. Dodatkowo, oceniając neurotoksyczny mechanizm działania 1BnTIQ należy wziąć pod uwagę nie tylko jego istotny wpływ na nasilenie procesów oksydacyjnych w metabolizmie dopaminy, ale równoczesne istotne hamowanie jej metabolizmu na ścieżce metylacji przy udziale COMT (istotny spadek zewnątrzneuronalnego metabolitu dopaminy, 3-MT) co dodatkowo potęguje procesy neurotoksyczne.

Tak więc z naszych badań wynika, że 1BnTIQ nie tylko zaburza funkcjonowanie układu dopaminowego doprowadzając do jego uszkodzeń, ale również znacząco osłabia efekty L-DOPA co może mieć istotne znaczenie kliniczne w terapii choroby Parkinsona [5].

III. Neuroprotecyjne działanie endogennej aminy, 1MeTIQ w mózgu szczura

1MeTIQ - metylowa pochodna TIQ jest szczególnie interesującą z punktu widzenia klinicznego endogenną aminą badaną także od wielu lat w Zakładzie Neurochemii IF PAN. Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują, że związek ten ma niezwykle szerokie i korzystne spektrum działania w OUN. 1MeTIQ wykazuje wpływ zarówno na układy monoaminergiczne (dopaminergiczny, serotonergiczny i noradrenergiczny) jak i układ glutaminianergiczny. 1MeTIQ jest mieszaniną (R-) i (S)-enancjomerów enzymatycznie syntetyzowanych z 2-feniloetyloaminy (PEA) i pirogronianu przez enzym syntazę 1MeTIQ zlokalizowany we frakcji mitochondrialnej synaptosomów w mózgu [Yamakawa i Ohta 1999]. Jak stwierdzono w badaniach neurochemicznych *in vitro* i *ex vivo*, 1MeTIQ jest odwracalnym inhibitorem aktywności enzymu monoaminooksydazy typu A i B (MAO-A i MAO-B) [Patsenka i Antkiewicz-Michaluk 2004]. Dzięki temu hamuje drogę oksydacji dopaminy i jednocześnie nasila drogę jej tleno-metylacji przy udziale COMTu. Jednocześnie związek ten nie zmienia stężenia samej dopaminy ani jej końcowego

metabolitu – HVA. Taki mechanizm działania 1MeTIQ jest szczególnie korzystny dla neuronów dopaminowych, gdyż w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia produkcji wolnych rodników i zapobiega procesom apoptozy. Dodatkowo, struktura chemiczna 1MeTIQ wykazuje efekt zmiatacza wolnych rodników, dzięki temu ma zdecydowane działanie ochronne/neuroprotektoryjne [2, 7]. Szczególnie istotnym z klinicznego punktu widzenia jak również interesującym z naukowego jest fakt, że na neuroprotektoryjne efekty 1MeTIQ nie rozwija się tolerancja (nawet po długotrwałym podawaniu siła działania 1MeTIQ na oznaczane parametry biochemiczne nie ulega zmianie). W naszych badaniach wykazaliśmy również, że 1MeTIQ ma powinowactwo do agonistycznej konformacji receptorów dopaminowych antagonizując behawioralne efekty apomorfiny i amfetaminy [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001]. Tak więc związek ten może spełniać rolę fizjologicznego modulatora aktywności układu dopaminowego, czy też endogennego neuroleptyku pozbawionego niekorzystnych efektów ubocznych tak charakterystycznych dla leków syntetycznych. W badaniach *in vivo* wykonanych metodą mikrodializy, 1MeTIQ (zarówno racemat jak i oba (R-) i (S)-enancjomery) podnosi nieznacznie poziom dopaminy w przestrzeni pozakomórkowej (do ok. 200%) i jednocześnie silnie zwiększa koncentrację jej zewnątrzneuronalnego metabolitu, 3-MT [2]. Należy zaznaczyć, że nieznacznie podniesiony poziom dopaminy w przestrzeni pozakomórkowej nie skutkuje nasileniem motoryki zwierząt, co dobrze rokuje w jego ewentualnym zastosowaniu w klinice. Należy także podkreślić, że neuroprotektoryjne działanie 1MeTIQ jest związane również z jego powinowactwem do receptora NMDA. Jak wykazaliśmy w badaniach *in vitro*, 1MeTIQ wykazuje istotne właściwości ochronne komórek ziarnistych mózdzku traktowanych kwasem glutaminowym. Natomiast w badaniach *in vivo* wykonanych metodą mikrodializy 1MeTIQ hamuje indukowany kwasem kainowym wyrzut aminokwasów pobudzających (glutaminianu i asparaginianu) do przestrzeni pozakomórkowej [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006]. Wpływ 1MeTIQ na układ glutaminergiczny został dodatkowo potwierdzony w kolejnych badaniach *in vivo*, w których 1MeTIQ hamuje zarówno pobudzenie motoryczne jak i wzrost uwalniania glutaminianu indukowany podaniem MK-801 [Pietraszek i wsp. 2009]. Wykonano także szereg eksperymentów, w których badaliśmy neuroprotektoryjne działanie 1MeTIQ po zastosowaniu różnych toksyn działających na komórki nerwowe w OUN. Pierwszą z nich był rotenon, który jest środowiskową toksyną oraz klasycznym inhibitorem mitochondrialnego kompleksu I, wykazującą selektywną toksyczność w stosunku do neuronów dopaminowych [Gutman i wsp. 1970; Horgan i wsp. 1968; Marey-Semper i wsp. 1993; Testa i wsp. 2005]. Po zastosowaniu rotenonu obserwuje się spadki uwalniania dopaminy oraz powstawanie tzw. ciał Lewy'ego, charakterystycznych dla choroby Parkinsona inkluzji białkowych [Betarbet i wsp. 2000]. Badania eksperymentalne prowadzone w naszym Zakładzie wykazały, że 1MeTIQ chroni zwierzęta przed indukowaną przez rotenon śmiertelnością oraz neurodegeneracjami

struktur pozapiramidowych [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2003, 2004]. W kolejnych badaniach *in vivo* wykonanych za pomocą metody mikrodializy prążkowiec wykazaliśmy, że oba enancjomery (R-) i (S)- 1MeTIQ blokują toksyczne efekty rotenonu, przywracając do poziomu kontrolnego obniżone przez rotenon stężenie uwalnianej do przestrzeni pozakomórkowej dopaminy [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2011].

Dalsze badania prowadzone były w oparciu o grant uzyskany w konkursie OPUS 4 (którego byłam kierownikiem), finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (**NCN 2012/07/B/NZ7/01149**), którego realizacja przewidziana była na lata 2013 – 2016. Celem tych badań była ocena neuroprotekcynowego potencjału 1MeTIQ w różnych zwierzęcych modelach choroby Parkinsona. Zastosowaliśmy 4 farmakologiczne modele w celu obrazowania różnych etapów choroby Parkinsona:

- Model 1BnTIQ - 1BnTIQ jest endogenną neurotoksyną, która wywołuje gwałtowne uwalnianie dopaminy oraz wielokrotne nasilenie szlaku jej oksydacji prowadząc do zwiększonej produkcji wolnych rodników, a w konsekwencji do uszkodzenia komórek dopaminowych [Kotake et al. 1996; Abe et al. 2001; Wąsik et al., 2009].
- Model rezerpinowy - polega na chronicznym podawaniu niskich dawek rezerpiny (0.1 do 0.2 mg/kg), która ma zdolność wyplukiwania katecholamin z zakończeń nerwowych. W efekcie uzyskujemy obniżenie transmisji neuroprzebieżników w mózgu (podobnie jak to ma miejsce np. w chorobie Parkinsona) co objawia się między innymi obniżoną aktywnością lokomotoryczną zwierząt, ale jeszcze bez objawów sztywności mięśniowej czy katalepsji [Fernandes et al. 2012].
- Model 6-hydroksydopaminowy (6-OHDA) - dostrukturalne i jednostronne podanie 6-OHDA, klasycznej neurotoksyny prowadzi do natychmiastowej śmierci komórek dopaminowych i wywołuje objawy podobne do symptomów choroby Parkinsona
- Model laktacystynowy - dostrukturalne i jednostronne podanie laktacystyny, selektywnego inhibitora proteasomu prowadzi do niekontrolowanego gromadzenia złogów białek (np. α -synukleiny) w neuronach. Podanie tej substancji do istoty czarnej prowadzi do apoptozy komórek dopaminowych i wywołuje objawy parkinsonizmu u szczurów [Lorenc-Koci et al. 2011].

Dwa pierwsze modele wywołują delikatne uszkodzenia w obrębie układu dopaminowego pozwalając na symulację wczesnych etapów choroby Parkinsona. Pozostałe 2 modele niszczą istotę czarną w mózgu obrazując zaawansowane stadium choroby.

W ramach tego grantu potwierdzono neuroprotekcynowe działanie 1MeTIQ w modelu wywołanym przez chroniczne iniekcje 1BnTIQ [Wąsik i wsp. 2016]. Chroniczne podania (przez 14 kolejnych dni) niskiej dawki 1BnTIQ (25 mg/kg i.p.) naśladują wczesną,

przedkliniczną fazę choroby Parkinsona, w której nie obserwujemy jeszcze widocznych zmian w zachowaniu zwierząt, a spadki poziomu dopaminy w układzie pozapiramidowym (istota czarna, prążkowie) są niewielkie. Natomiast występują już wyraźne zaburzenia funkcji neuronów dopaminowych związane głównie z uszkodzeniem podstawowych mechanizmów transportujących i magazynujących neuroprzekaźnik.

1MeTIQ był podawany w dwóch dawkach (25 i 50 mg/kg i.p.) albo chronicznie 20 minut przed iniekcją 1BnTIQ (badano rozwój) albo jednorazowo przed ostatnią dawką 1BnTIQ (badano ekspresję). Behawioralny test wykazał, że 1BnTIQ podawany chronicznie powoduje znamienny wzrost ruchliwości eksploracyjnej szczurów. 1MeTIQ podany jednorazowo przed ostatnią dawką 1BnTIQ całkowicie blokuje ten efekt obniżając motorykę zwierząt poniżej poziomu grupy kontrolnej. Podobny efekt był obserwowany w grupach, gdzie 1MeTIQ był podawany chronicznie łącznie z wielokrotnymi iniekcjami 1BnTIQ. Pomiar katalepsji nie wykazał, znamiennych zmian kataleptycznych u szczurów po wielokrotnych iniekcjach 1BnTIQ (choć zwierzęta były wyraźnie spokojniejsze w porównaniu z grupą kontrolną). 1MeTIQ podawany łącznie z 1BnTIQ nie wpływa znamienne na zachowanie zwierząt w tym teście.

Analiza chromatograficzna wykazała, że chroniczne podawanie 1BnTIQ powoduje znamienne spadki poziomu dopaminy w prążkowie natomiast, 1MeTIQ całkowicie antagonizuje działanie 1BnTIQ podnosząc poziom dopaminy do wartości kontrolnych. Wyniki badań wskazują, że wielokrotne iniekcje 1BnTIQ podnoszą poziom serotoniny w prążkowie szczura (o około 30%) ten wzrost jest silnie potęgowany przez łączne podanie 1MeTIQ (o około 100%). Natomiast podniesiony (o około 50%) przez wielokrotne podanie 1BnTIQ poziom 5HIAA jest obniżany gdy razem z 1BnTIQ podano 1MeTIQ. Z badań *ex vivo* wynika, że wielokrotne iniekcje 1BnTIQ powodują spadek poziomu noradrenaliny (około 50%) w prążkowie szczura. Efekt ten jest całkowicie odwracany zarówno przez jednorazowe jak i chroniczne podania 1MeTIQ (poziom noradrenaliny w grupach łącznych jest podniesiony do poziomu kontrolnego [dawka 25 mg/kg i.p.] lub powyżej ok. 100% [dawka 50 mg/kg i.p.]). Następnie wykonano eksperyment *in vivo* metodą mikrodializy. Badanie to wykazało, że chroniczne iniekcje 1BnTIQ wywołują patologiczny wzrost uwalniania dopaminy do przestrzeni pozakomórkowej o około 300% w próbkach bazalnych, utrzymujący się do końca trwania eksperymentu. Efekt ten jest całkowicie blokowany przez chroniczne podania 1MeTIQ.

Przedstawione w powyższych eksperymentach wyniki wyraźnie wskazują na przeciwstawny kierunek działania endogennych amin 1BnTIQ i 1MeTIQ w OUN. Co istotne, niekorzystne efekty 1BnTIQ są całkowicie blokowane przez wcześniejsze zaaplikowanie 1MeTIQ. Możemy zatem wnioskować, że podniesienie stężenia 1MeTIQ w OUN zapobiega toksycznym efektom 1BnTIQ. Ponieważ obie aminy mają powinowactwo do DAT w związku z tym 1MeTIQ konkuruje o dostęp do transportera z 1BnTIQ.

Wcześniejsze iniekcje 1MeTIQ zapewniają mu przewagę we wnikanii do neuronów dopaminowych. Zarówno 1MeTIQ jak i 1BnTIQ są syntetyzowane endogennie w mózgu ssaków [Yamakawa i Ohta 1999; Kotake i wsp. 1995] jednak w naturalnych warunkach ilość endogennego 1MeTIQ kilkukrotnie przewyższa ilość endogennego 1BnTIQ [Yamakawa i wsp. 1999]. Natomiast w sytuacji patologicznej, u osób chorych na chorobę Parkinsona te proporcje się zmieniają tzn. ilość 1BnTIQ wzrasta ponad 3-krotnie podczas gdy ilość 1MeTIQ spada [Kotake i wsp. 1995]. Wydaje się więc, że z klinicznego punktu widzenia bardzo istotne jest zachowanie naturalnego balansu pomiędzy tymi dwoma endogennymi aminami. A jeśli ta równowaga zostanie zachwiana to procesy niekorzystne zaczynają dominować nad procesami naprawczymi i może to doprowadzić do rozwoju choroby.

W kolejnym cyklu eksperymentów potwierdzono neuroprotekcyjne działanie 1MeTIQ w modelu rezerpinowym. Jak wiadomo, rezerpina jest inhibitorem pęcherzykowego transportera monoamin (VMAT2), którego główną funkcją jest regulowanie środowiska cytozolu w neuronach oraz ich ochrona przed endo- i egzogennymi toksynami [Uhl 1998; Miller i wsp. 1999]. Wielokrotne iniekcje niskiej dawki rezerpiny zakłócają magazynowanie monoamin w pęcherzykach synaptycznych prowadząc do obniżenia poziomu monoamin w zakończeniach synaptycznych i wywołując spadek ruchliwości oraz sztywność mięśniową [Colpaert 1987; Gerlach i Riederer 1996; Lorenc-Koci i wsp. 1995; Rung i wsp. 2011]. W naszych eksperymentach rezerpina była podawana wielokrotnie (14 dni) w niskiej dawce 0.2mg/kg w celu uzyskania subtelnych zaburzeń w funkcjonowaniu układów monoaminergicznych modelujących wczesny/utajony etap choroby Parkinsona. 1MeTIQ był zastosowany w dwóch dawkach (25 i 50 mg/kg i.p.) albo chronicznie 20 minut przed iniekcją rezerpiny (badano wpływ 1MeTIQ na rozwój zaburzeń wywołanych rezerpiną), albo jednorazowo przed ostatnią dawką rezerpiny (badano wpływ 1MeTIQ na ekspresję zaburzeń wywołanych rezerpiną).

Pomiar aktywności lokomotorycznej wykazał, że rezerpina podawana chronicznie powoduje spadek ruchliwości eksploracyjnej szczurów. Natomiast 1MeTIQ podany jednorazowo i chronicznie nasila ten efekt rezerpiny powodując znamienne spadki aktywności eksploracyjnej zwierząt. Podczas pomiaru katalepsji zaobserwowano, słabe zmiany kataleptyczne u szczurów (zwierzęta były wyraźnie spokojniejsze w porównaniu z grupą kontrolną) po wielokrotnych iniekcjach niskiej dawki rezerpiny. Natomiast chroniczne podania 1MeTIQ odwracają ten efekt rezerpiny. Takie wyniki sugerują, że 1MeTIQ zapobiega sztywności mięśniowej wywoływanej przez rezerpinę.

Analiza chromatograficzna wykazała, że w prążkowie chroniczne podania rezerpiny nie wywołują zmian w poziomie dopaminy ani jej metabolitów. W tym samym eksperymencie zaobserwowano natomiast, znamienne wzrost szybkości szlaku oksydacji dopaminy po chronicznych iniekcjach rezerpiny. Takie działanie rezerpiny zwiększa

produkcję wolnych rodników i nasila stres oksydacyjny. Ponadto wykazano, że zwierzęta traktowane rezerpiną mają obniżony poziom endogennych antyoksydantów takich jak: glutation (GSH), dysmutazę ponadtlenkową (SOD) czy katalazę [Sanghavi i wsp. 2011]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że ten toksyczny efekt rezerpiny jest całkowicie antagonizowany przez 1MeTIQ. To ochronne działanie 1MeTIQ jest związane z przekierowaniem metabolizmu dopaminy ze ścieżki oksydacji na ścieżkę o-metylacji (blokowanie aktywności MAO oraz nasilanie aktywności COMT) oraz ze zdolnością do zmiatania już wytworzonych wolnych rodników [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001; 2003; 2004]. Uzyskane w tych badaniach wyniki wskazują, że wielokrotne iniekcje rezerpiny nieznacznie podnoszą szybkość metabolizmu serotoniny w prążkowie szczura. Efekt ten jest odwracany zarówno przez jednorazowe jak i chroniczne iniekcje 1MeTIQ. Zaobserwowano także spadki poziomu noradrenaliny (około 40%) w prążkowie szczura po chronicznych iniekcjach rezerpiny. Efekt ten jest całkowicie odwracany z przez chroniczne podania 1MeTIQ (poziom noradrenaliny w grupach łącznych jest zbliżony do grupy kontrolnej).

Podczas eksperymentu *in vivo* wykonanego metodą mikrodializy zaobserwowano spadek uwalniania dopaminy do przestrzeni pozakomórkowej o około 30% wywołany przez chroniczne iniekcje rezerpiny. Natomiast wielokrotne podania 1MeTIQ łącznie z rezerpiną indukują wzrost uwalniania dopaminy w próbkach bazalnych o około 200% , który utrzymuje się do końca pomiaru. Uzyskane w tym eksperymencie dane wskazują, że chroniczne iniekcje 1MeTIQ zapobiegają toksycznemu efektom rezerpiny i dzięki temu funkcja neuronów dopaminowych pozostaje niezakłócona.

Kontynuując badania neuroprotektoryjnych właściwości 1MeTIQ wykonaliśmy eksperymenty sprawdzające działanie 1MeTIQ w modelu 6-OHDA [7]. 6-OHDA jest strukturalnym analogiem katecholamin, dopaminy i noradrenaliny. Ta neurotoksyna jest szeroko stosowana do modelowania PD zarówno w badaniach *in vivo* jak i *in vitro* [Luthman i wsp. 1989]. Ponieważ związek ten słabo penetruje do mózgu przez barierę krew-mózg dlatego konieczna jest infuzja tej substancji bezpośrednio do określonej struktury mózgu. Zastosowany przez nas model 6-OHDA polega na dostrukturalnym (do istoty czarnej) i jednostronnym podaniu 6-OHDA, klasycznej neurotoksyny i prowadzi do natychmiastowej śmierci komórek dopaminowych wywołując objawy podobne do symptomów choroby Parkinsona. Neurotoksyczny mechanizm działania 6-OHDA polega na enzymatycznej i nie-enzymatycznej produkcji cytotoxycznych związków przy wykorzystaniu jonów magnezu i żelaza [Cadet i Brannock 1998]. Natomiast oksydacja 6-OHDA przy udziale MAO_A prowadzi do powstawania wolnych rodników [Cohen 1984; Sachs i Jonson 1975] i w rezultacie do uszkodzenia a następnie śmierci neuronów katecholaminowych.

W naszym eksperymencie po wykonaniu jednostronnej lezji istoty czarnej przy użyciu 6-OHDA (8µg/2µl) podawano 1MeTIQ w dwóch dawkach (25 i 50 mg/kg i.p) jednorazowo (w 14 dniu po lezji) lub chronicznie (przez kolejnych 14 dni), przy czym pierwsza dawka była podana 3 godziny po lezji 6-OHDA. Podczas pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt nie zaobserwowano znamienych zmian po jednostronnej lezji 6-OHDA. Natomiast w grupie łącznej zarówno z jednorazową iniekcją jak i z chronicznymi podaniami 1MeTIQ zaobserwowano znamienne spadki aktywności eksploracyjnej szczurów [7]. Podobny efekt tj. spadek aktywności eksploracyjnej był obserwowany we wcześniejszych eksperymentach gdzie 1MeTIQ był podawany oddzielnie [Wąsik i wsp. 2016]. Takie działanie 1MeTIQ można wyjaśnić poprzez dwa mechanizmy: 1) 1MeTIQ jest częściowym agonistą dopaminowym i może blokować aktywną konformację receptorów dopaminowych [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2014]; 2) 1MeTIQ znamienne podnosi zewnątrzneuronalne stężenie 3-MT [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001]. A jak dowodziliśmy wcześniej, 3-MT wykazuje powinowactwo do α -adrenergicznych receptorów blokując ich aktywność, w efekcie związek ten może odgrywać rolę endogenego inhibitora regulującego nadmierną stymulację neuronów katecholaminergicznych [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2008]. W kolejnym teście zaobserwowano, że jednostronna lezja 6-OHDA wywołuje silną katalepsję po stronie kontralateralnej (nieuszkodzonej), a efekt ten jest osłabiany przez chroniczne podania 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg i.p. Ową asymetrię można wyjaśnić pojawiającą się w czasie rozwoju uszkodzeń nadwrażliwością receptorów dopaminergicznych oraz zaburzeniem równowagi między dopaminą a serotoniną (ze zwiększonym udziałem układu serotonergicznego). Wiele badań z selektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) sugeruje, że zwiększona aktywność serotonergiczna prądkowia może zmniejszyć funkcje dopaminergiczne, a tym samym powodować objawy pozapiramidowe np. sztywność mięśniową czy bradykinezę [Arya 1994].

Wyniki badań biochemicznych *ex vivo* wykazały, że zarówno w prądkowiu jak i istocie czarnej jednostronna lezja 6-OHDA spowodowała znamienne spadki stężenia dopaminy (ok. 80%) oraz jej metabolitów: DOPAC (80%), 3-MT (70%) i HVA (70%) po stronie ipsilateralnej. Wcześniejsze badania innych autorów wykazały podobne spadki stężenia dopaminy w jądrach podstawnych (basal ganglia) u pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona [Damier i wsp. 1999; Kalia i Lang 2015]. Jednorazowa iniekcja 1MeTIQ nie zmieniała efektu lezji 6-OHDA. W przypadku strony kontralateralnej, nie zaobserwowano zmian po lezji 6-OHDA, natomiast jednorazowe iniekcje 1MeTIQ podwyższyły stężenie dopaminy (20%). W tym eksperymencie wykazano również znamienne spadki stężenia noradrenaliny (ok.80%) po lezji 6-OHDA oraz brak zmian w poziomie serotoniny w obu strukturach po stronie ipsilateralnej. Jednorazowa iniekcja 1MeTIQ nie zmieniała efektu lezji 6-OHDA. W przypadku strony kontralateralnej, 6-OHDA nie wpływała na poziom noradrenaliny i serotoniny. Uzyskane wyniki wyraźnie

wskazują na brak zdolności regeneracyjnych 1MeTIQ. Związek ten zaaplikowany szczurom w 2 tygodnie po lezji 6-OHDA nie jest w stanie odtworzyć zniszczonych przez toksynę neuronów dopaminowych [7]. W następnej kolejności zbadano również wpływ chronicznych iniekcji 1MeTIQ na efekty jednostronnej lezji 6-OHDA istoty czarnej na zawartość dopaminy i jej metabolitów w prążkowie i istocie czarnej szczura. Chroniczne iniekcje 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg i.p. nieco osłabiło toksyczny efekt 6-OHDA: spadki poziomu dopaminy wynosiły ok. 70%. Istotny jest fakt, że po stronie kontralateralnej, 1MeTIQ znamienne podnosił poziom dopaminy. Te dane sugerują, że chroniczne iniekcje 1MeTIQ stymulują nieuszkodzone neurony do wzrostu aktywności. Relatywnie wysoki poziom dopaminy w porównaniu z grupą lezionowaną może być efektem tego, że codzienne iniekcje 1MeTIQ zarówno silnie stymulują produkcję neuroprzekaźnika jak i stale blokują produkcję wolnych rodników oraz usuwają z neuronów już wytworzone wolne rodniki. Taki mechanizm działania 1MeTIQ pozwolił na wywołanie ochronnego efektu oraz osłabienie neurodegeneracji szlaku czarno-prążkowiego. Natomiast chroniczne iniekcje 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg i.p. nie zmieniały toksycznych efektów lezji 6-OHDA. Nie zaobserwowano także zmian w poziomie serotoniny w grupie po lezji 6-OHDA ani w grupach łącznych z chronicznymi iniekcjami 1MeTIQ.

Z kolei eksperyment *in vivo* wykazał, że jednostronna lezja 6-OHDA spowodowała drastyczny spadek uwalniania dopaminy (95%) do przestrzeni pozakomórkowej w próbkach bazalnych, utrzymujący się do końca trwania eksperymentu. Efekt ten jest całkowicie blokowany przez chroniczne podania 1MeTIQ (50 mg/kg i.p.) i w grupie łącznej poziom uwalnianej dopaminy w próbkach bazalnych był porównywalny z poziomem neuroprzekaźnika w grupie kontrolnej. Natomiast po podaniu ostatniej dawki 1MeTIQ uwalnianie dopaminy wzrosło do ok. 400%. W grupie łącznej, gdzie 1MeTIQ był podawany jednorazowo (14 dni po lezji 6-OHDA) stężenie dopaminy wzrasta do poziomu kontrolnego po podaniu związku. Dane uzyskane z badania *in vivo* potwierdzają ochronne działanie 1MeTIQ przy zastosowaniu wielokrotnych podań tego związku. Na pewno istotne, znaczenie ma czas rozpoczęcia iniekcji 1MeTIQ, gdyż pierwsza dawka była podana już 3 godziny po lezji 6-OHDA, a następnie kontynuowano aplikowanie związku przez kolejne 14 dni w odstępach 24 godzinnych. Tak więc, z jednej strony 1MeTIQ mógł ograniczyć wnikanie toksyny do wnętrza neuronu poprzez blokadę transportera dopaminowego, z drugiej strony usuwał wolne rodniki wytworzone w wyniku działania 6-OHDA oraz hamował ich dalszą produkcję. Dzięki takiemu mechanizmowi działania 1MeTIQ mógł utrzymywać funkcjonowanie neuronów dopaminowych w granicach normy fizjologicznej.

W ramach grantu OPUS 4 wykonano także eksperymenty oceny neuroprotektynowego potencjału 1MeTIQ z wykorzystaniem zaburzeń w transmisji monoaminergicznej po lokalnym podaniu inhibitora proteasomu – laktacystyny do istoty czarnej mózgu

szczura. System ubikwityna-proteasom jest jednym z najważniejszych komórkowych mechanizmów służących degradacji białek. Zaburzenia w funkcjonowaniu tego systemu prowadzą do agregacji źle pofałdowanych białek i odgrywają znaczącą rolę w etiopatologii choroby Parkinsona [Kitada i wsp. 1998; Leroy i wsp. 1998; McNaught i Jenner 2001]. W celu lepszego zrozumienia zaangażowania systemu ubikwityna-proteasom w degradację neuronów dopaminowych badano różne inhibitory proteasomu w zwierzęcych modelach [Fornai i wsp. 2003; McNought i wsp. 2004; Xie i wsp. 2010]. Laktacystyna, która jest selektywnym i nieodwracalnym inhibitorem proteasomu, musi być podawana lokalnie domózgowo ponieważ nie przechodzi przez barierę krew-mózg. Jak wykazują badania, toksyna ta wywołuje silne spadki poziomu dopaminy w prążkowie i istocie czarnej oraz formowanie cytoplazmatycznych inkluzji białkowych [McNaught i wsp. 2002; Lorenc-Koci i wsp. 2011; Konieczny i wsp. 2016]. W naszych badaniach model laktacystynowy polegał na dostrukturalnym (do istoty czarnej) i jednostronnym podaniu laktacystyny w dawce 5µg/2µl.

Behawioralny test wykazał, że lezja laktacystyną nie zmieniła aktywności lokomotorycznej zwierząt, natomiast w grupach łącznych z chronicznymi podaniami 1MeTIQ zaobserwowano znamienne spadki aktywności eksploracyjnej szczurów. Jak wyjaśniałam powyżej (w modelu 6-OHDA), jest to efekt charakterystyczny dla mechanizmu działania częściowego agonisty dopaminy jakim jest 1MeTIQ.

W badaniach *ex vivo* analiza chromatograficzna wykazała, że w prążkowie jednostronna lezja laktacystyną spowodowała znamienne spadki stężenia dopaminy (ok. 50%) po stronie ipsilateralnej (uszkodzonej). Natomiast jednorazowe i wielokrotne iniekcje 1MeTIQ (1x i 7x) częściowo odwracały efekt tej lezji. Istnieją badania, które pokazują, że laktacystyna *per se* nie jest zdolna do zablokowania proteasomu. Ale w środowisku uwodnionym łatwo przekształca się w formę β-laktonu, który jest silnym inhibitorem proteasomu [Dick i wsp. 1996]. Wykazano także, że glutation (GSH), który jest naturalnym zmiataczem wolnych rodników, inaktywuje β-lakton przekształcając go do bezpiecznej formy laktationu. Dzięki temu GSH odgrywa ważną rolę ochronną w neuronach dopaminowych zapobiegając ich degradacji [Dick i wsp. 1997]. Podobnie do GSH działa 1MeTIQ odgrywając funkcję naturalnego zmiatacza wolnych rodników. Być może, 1MeTIQ ma również zdolność hamowania aktywności β-laktonu i dlatego w naszym eksperymencie zaobserwowano osłabienie toksycznego działania laktacystyny. W tym badaniu nie wykazano zmian po stronie kontralateralnej. Badania wykazały, że w prążkowie jednostronna lezja laktacystyną spowodowała znamienne spadki stężenia serotoniny (ok. 30%) a efekt ten był całkowicie odwracany zarówno przez jednorazowe jak i wielokrotne iniekcje 1MeTIQ. Jednocześnie nie obserwowano zmian w poziomie noradrenaliny. Badania western blot wykazały spadek poziomu hydroksylazy tyrozynowej (TH) w grupie z lezją

laktacystynową, a efekt ten był całkowicie odwracany przez wielokrotne iniekcje 1MeTIQ. W naszych eksperymentach nie zanotowano zmian w ekspresji α -synukleiny. Nie zaobserwowano także zmian w aktywności kaspazy-3 w hipokampie szczura zarówno po lezji jak i w grupie łącznej z 1MeTIQ. Natomiast ekspresja anty-apoptotycznego białka Bcl-2 w grupie z lezją laktacystyną była znamienne obniżona i efekt ten był odwracany w grupie łącznej z 1MeTIQ. Z uzyskanych wyników badań zarówno neurochemicznych jak i molekularnych wyraźnie widać, że 1MeTIQ wykazuje potencjał neuroprotekcyny ponieważ częściowo osłabia toksyczne efekty laktacystyny. Podobnie jak w poprzednim modelu (6-OHDA) kolosalne znaczenie odgrywa czas w jakim został podany 1MeTIQ po dokonaniu lezji. Im szybciej zaaplikujemy związek neuroprotekcyny tym więcej neuronów dopaminowych nie ulegnie destrukcji. W przypadku chronicznych iniekcji pierwsza dawka 1MeTIQ była podana 3 godziny po lezji laktacystynowej. Natomiast dawka jednorazowa była podana 7 dni po lezji i dlatego w tej grupie nie zaobserwowano znamienych efektów działania 1MeTIQ. W badaniach *in vivo* wykazano, że jednostronna lezja laktacystyną spowodowała spadek uwalniania dopaminy (50%) do przestrzeni pozakomórkowej w próbkach bazalnych, utrzymujący się do końca trwania eksperymentu. Efekt ten jest całkowicie blokowany przez wielokrotne iniekcje 1MeTIQ (50 mg/kg i.p.). Jednocześnie we wszystkich grupach lezionowanych zaobserwowano silne spadki poziomu 3-MT (ok. 70%) w próbkach bazalnych. A jednorazowa iniekcja 1MeTIQ spowodowała wzrost poziomu 3-MT do ok. 2500%, natomiast w grupie z wielokrotnymi podaniami 1MeTIQ stężenie 3-MT wzrosło około 1500%. Takie potężne wzrosty stężenia 3-MT świadczą o uwolnieniu znacznej ilości dopaminy do przestrzeni pozakomórkowej. 3-MT jest zewnątrz neuronalnym metabolitem dopaminy i wskaźnikiem jej pojawienia się w synapsie [Egan i wsp. 1991; Karoum i wsp. 1994]. Wzrost poziomu 3-MT ma bardzo korzystny wpływ na kondycję neuronów dopaminowych, ponieważ ta molekula chroni neurony przed działaniem stresu oksydacyjnego [Miller i wsp. 1996]. Jednocześnie związek ten ma własne działanie receptorowe, wykazując powinowactwo do receptorów α -adrenergicznych oraz D1 i D2 wpływa hamująco na motorykę zwierząt [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2008]. Podobnie jak w poprzednim modelu, chroniczne iniekcje 1MeTIQ pozwalają na zachowanie aktywności neuronów dopaminowych na poziomie podobnym do fizjologicznego (obserwowanym w grupie kontrolnej).

Podsumowując w punktach przedstawione powyżej badania nad rolą endogennych amin: 1BnTIQ i 1MeTIQ w procesie neurodegeneracji i neuroprotekcji w OUN, chciałabym podkreślić istotne mechanizmy, które w nich uczestniczą:

1. Neurotoksyczność 1BnTIQ wiąże się głównie z jego rezerpino-podobnym działaniem na VMAT2 oraz istotnym nasileniem MAO-zależnego szlaku oksydacji dopaminy i generowaniem wolnych rodników. Wydaje się, że dla prawidłowego funkcjonowania

mózgu bardzo istotny jest właściwy balans pomiędzy stężeniem 1MeTIQ i 1BnTIQ. W oparciu o badania kliniczne można stwierdzić, że w zdrowym mózgu 1MeTIQ występuje w koncentracji kilkukrotnie wyższej niż 1BnTIQ, natomiast u osób z chorobami neurodegeneracyjnymi mózgu (choroba Parkinsona) ta proporcja ulega wyraźnemu odwróceniu.

2. W przeciwieństwie do 1BnTIQ neuroprotektynne działanie 1MeTIQ wiąże się z przestrojeniem katabolizmu dopaminy ze szlaku MAO-zależnej oksydacji na zależny od aktywności COMTu szlak O-metylacji. 1MeTIQ posiada właściwości odwracalnego inhibitora MAO oraz jest zmiataczem wolnych rodników, szczególnie toksycznego rodnika hydroksylowego, co w istotny sposób sprzyja neuroprotekcji. Dodatkowo, 1MeTIQ posiada także umiarkowane powinowactwo do receptora NMDA antagonizując całkowicie ekscytotoksyczne działanie glutaminianu w OUN.

IV. Przeciwdepresyjne działanie 1MeTIQ

Dzięki badaniom finansowanym przez grant **DeMeTer POIG.01.01.02-12-004/09** wykazaliśmy, że 1MeTIQ ma silne właściwości przeciwdepresyjne [3, 6]. Jedną z głównych teorii depresji jest teoria monoaminergiczna. Teoria ta zakłada, że u podstaw patogenezy depresji leżą zaburzenia w funkcjonowaniu systemu noradrenergicznego i/lub serotonergicznego. Stwierdzono, że obniżenie stężenia tych dwóch neuroprzekaźników prowadzi do rozwoju depresji [Elhwuegi 2004]. Istnieją badania wykazujące rolę dopaminy w patogenezie depresji [Brown i Gershon 1993]. Wyniki z badań biochemicznych potwierdzają rolę systemu dopaminergicznego w efektach przeciwdepresyjnych leków badanych w teście wymuszonego pływania (FST) [Renard i wsp. 2003]. Istnieją badania wskazujące, że związki neuroprotektynne posiadają także właściwości przeciwdepresyjne [Scapagnini i wsp. 2012]. Jak wspomniałam wcześniej, 1MeTIQ wykazuje neuroprotektynne właściwości [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2003, 2004, 2011; Wąsik i wsp. 2016]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że obwodowe iniekcje 1MeTIQ (10, 25 50 mg/kg i.p.) wywołują efekty przeciwdepresyjne u szczurów w teście wymuszonego pływania: dawkozależnie skracają czas bezruchu. Jednocześnie w tym samym eksperymencie zaobserwowano znamienne wydłużenie czasu pływania oraz wspinania [3]. Warto podkreślić, że 1MeTIQ zastosowany w najwyższej dawce, 50 mg/kg, indukował silniejszy efekt niż referencyjny lek przeciwdepresyjny, imipramina (30 mg/kg i.p.). Natomiast pomiar aktywności lokomotorycznej zwierząt wykazał, że 1MeTIQ obniżył ruchliwość szczurów. Te dane sugerują, że 1MeTIQ nie wykazuje właściwości psychostymulujących a wydłużony czas pływania w FST jest efektem wzrostu motywacji do ucieczki z sytuacji stresującej, którą niewątpliwie jest umieszczenie zwierzęcia w

cyldrze wypełnionym wodą. Dane neurochemiczne z eksperymentu *ex vivo* wykazują, że 1MeTIQ indukuje znamienny wzrost stężenia serotoniny z jednoczesnym spadkiem poziomu jej metabolitu, 5-HIAA. Przy czym efekt ten był silniejszy niż zmiany wywołane przez imipraminę [3]. We wcześniejszych badaniach wykazano, że 1MeTIQ jest odwracalnym inhibitorem aktywności enzymu MAO_A (wartość IC₅₀ wynosi 32μM) oraz MAO_B (wartość IC₅₀ wynosi 164μM) [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2001; Patsenka i Antkiewicz-Michaluk 2004]. 1MeTIQ jako inhibitor MAO_A podnosi poziom serotoniny, natomiast imipramina jest inhibitorem transportera serotoninowego (SERT) aktywuje system serotonergiczny poprzez zahamowanie szybkości metabolizmu serotoniny na drodze sprzężenia zwrotnego [Grunewald i wsp. 1979; Javaid i wsp. 1979]. Inhibitory MAO wykazują kilka szczególnie korzystnych z terapeutycznego punktu widzenia cech np. osłabianie szlaku oksydacji podczas katabolizmu monoamin oraz właściwości antyoksydacyjne [Youdim i wsp. 2006]. Szereg autorów zaobserwowało, że inhibitory MAO (takie jak selegilina czy moklobemid) wykazują właściwości przeciwdepresyjne w różnych zwierzęcych modelach [Cryan i wsp. 2005; Kitamura i wsp. 2008; Miura i wsp. 1996; Youdim i Bakhle 2006]. Badania kliniczne wykazały, że moklobemid jest bezpieczny i dobrze tolerowany przez pacjentów ze stanami depresyjnymi [Versiani i wsp. 1989].

W kolejnych eksperymentach testowaliśmy przeciwdepresyjne właściwości 1MeTIQ (10 mg/kg *i.p.*) w połączeniu z niską dawką dezypraminy (10 mg/kg *i.p.*), klasycznego trójcyklicznego leku przeciwdepresyjnego [6]. 1MeTIQ podany łącznie z dezypraminą znamienne skracał czas bezruchu w FST a efekt ten był silniejszy niż w grupie z samym 1MeTIQ. Jednocześnie w grupie łącznej zaobserwowano wzrost czasu pływania zwierząt. W przeciwieństwie do grup z samym 1MeTIQ i dezypraminą, gdzie zaobserwowano wzrost czasu wspinania. Jak wykazał Detke i wsp. [1995], wzrost czasu wspinania jest związany ze wzrostem aktywności systemu noradrenergicznego podczas gdy wzrost aktywności układu serotonergicznego skutkuje wydłużonym czasem pływania w FST. Uzyskane wyniki potwierdzają, że 1MeTIQ podobnie jak dezypramina wpływa głównie na system katecholaminergiczny, podczas gdy łączne podanie obu substancji aktywuje system serotonergiczny.

Maes i wsp. [2009] postuluje nową teorię depresji, którą nazwał „zapalna i neurodegeneracyjna hipoteza depresji”. Ta teoria zakłada, że procesy pro-zapalne oraz zwiększające stres oksydacyjny prowadzą do rozwoju depresji [Maes i wsp. 2008]. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że 1MeTIQ w przeciwieństwie do dezypraminy, silnie wpływa na układ dopaminowy: zwiększając stężenie dopaminy i 3-MT a jednocześnie obniżając poziom DOPAC [6]. Taki mechanizm działania 1MeTIQ wywołuje bardzo korzystny efekt, gdyż powoduje zahamowanie stresu oksydacyjnego. Natomiast

zwiększenie stężenia dopaminy może mieć również znaczenie przeciwdepresyjne. W opinii niektórych autorów dopamina odgrywa ważną rolę przez modulowanie emocji i symptomów motorycznych [Byrum i wsp. 1999; Newberg i wsp. 2007; Rogers i wsp. 1998]. Zwrócono także uwagę na fakt, że pacjenci z ciężką depresją mają obniżoną funkcję dopaminy w prążkowie [Shah i wsp. 1997].

Mechanizm przeciwdepresyjnego działania 1MeTIQ może być związany zarówno z odwracalnym blokowaniem aktywności MAO prowadzącym do umiarkowanego wzrostu poziomu dopaminy i serotoniny w synapsie jak i hamowaniem procesów oksydacyjnych w monoaminergicznych neuronach i równoczesnym zmniejszeniem stężenia wolnych rodników. Badania innych autorów potwierdzają nasze obserwacje i wyraźnie wskazują na przeciwdepresyjne działanie związków o charakterze neuroprotekcijnym.

V. Generalne Wnioski

1. 1BnTIQ jest endogenną neurotoksyną silnie oddziałującą na katabolizm dopaminy w OUN szczura. Działanie tego związku polega na nasileniu aktywności enzymu MAO i równoczesnym hamowaniu aktywności enzymu COMT. W efekcie obserwujemy zwiększoną oksydację dopaminy co prowadzi do nasilenia produkcji wolnych rodników i stresu oksydacyjnego. Drugim toksycznym mechanizmem działania 1BnTIQ jest uszkodzenie transportera dopęcherzykowego (VMAT2), co powoduje zgromadzenie dopaminy w cytozolu i również doprowadza do nasilenia stresu oksydacyjnego. Ponadto wysokie stężenie 1BnTIQ ma działanie pro-apoptotyczne: zwiększa aktywność kaspazy-3 oraz nasila uwalnianie LDH.
2. 1MeTIQ jest endogennym związkiem o charakterze neuroprotekcijnym. Związek ten jest odwracalnym inhibitorem MAO_A i MAO_B oraz aktywatorem COMT. Dzięki takiemu działaniu obserwujemy zahamowanie oksydacji dopaminy, co prowadzi do spadku produkcji wolnych rodników i stresu oksydacyjnego. Dodatkowo 1MeTIQ ma zdolność zmiatania wolnych rodników, więc jego działanie antyoksydacyjne jest bardzo silne. Ponadto związek ten podnosi stężenie dopaminy w przestrzeni pozakomórkowej co ma istotne znaczenie w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona, gdzie dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu systemu dopaminowego.
3. Obie badane endogenne aminy, 1BnTIQ i 1MeTIQ mają przeciwstawny mechanizm działania w OUN. Wydaje się, że dla prawidłowego funkcjonowania

bardzo istotne jest zachowanie właściwego balansu pomiędzy oboma związkami tzn. zwiększenie ilości 1BnTIQ lub spadek poziomu 1MeTIQ może doprowadzić do uruchomienia kaskady zdarzeń doprowadzających do śmierci neuronów dopaminowych i rozwoju choroby Parkinsona.

4. 1MeTIQ jako związek neuroprotekcyny wykazuje także działanie przeciwdepresyjne. W teście wymuszonego pływania (FST) oraz teście zawieszenia za ogon (TST). 1MeTIQ dawko-zależnie skraca czas bezruchu. Jednocześnie związek ten nie ma właściwości pobudzających dlatego zwiększona aktywność zwierząt w FST i TST świadczy o zwiększonej motywacji i woli ucieczki ze stresowego środowiska. Przeciwdepresyjne działanie 1MeTIQ jest związane z podniesieniem poziomu tkankowego dopaminy i serotoniny oraz z umiarkowanym zwiększeniem ich uwalniania do przestrzeni pozakomórkowej. Dodatkowo, zarówno hamowanie produkcji wolnych rodników jak i możliwość ich zmiatania może nasilać przeciwdepresyjne efekty 1MeTIQ.

Agnieszka Wąsik

Dr Agnieszka Wąsik

Literatura:

Abe K, Taguchi K, Wasai T, Ren J, Utsunomiya I, Shinohara T, Miyatake T, Sano T (2001) Stereoselective effect of (R)- and (S)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines on mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 56:55-60

Abe K, Saitoh T, Horiguchi Y, Utsunomiya I, Taguchi K (2005) Synthesis and neurotoxicity of tetrahydroisoquinoline derivatives for studying Parkinson's disease. *Biol Pharm Bull* 28: 1355-1362

Antkiewicz-Michaluk L, Michaluk J, Romańska I, Papla I, Vetulani J (2000) Antidopaminergic effects of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol. *J Neural Transm* 107: 1009-1019

Antkiewicz-Michaluk L, Michaluk J, Mokrosz M, Romańska I, Lorenc-Koci E, Otha S, Vetulani J (2001) Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties. *J Neurochem* 78: 100-108

Antkiewicz-Michaluk L, Karolewicz B, Romańska I, Michaluk J, Bojarski AJ and Vetulani J (2003) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline protects against rotenone-induced mortality and biochemical changes in rat brain. *Eur J Pharmacol* 466: 263-269

Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, Michaluk J, Romańska I, Bojarski A, Vetulani J (2004) Protective effect of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline against dopaminergic neurodegeneration in the extrapyramidal structures produced by intracerebral injection of rotenone. *Inter J Neuropsychopharmacol* 7: 155-163

Antkiewicz-Michaluk L, Łazarewicz JW, Patsenka A, Kajta M, Ziemińska E, Salińska E, Wąsik A, Gołębiewska K, Vetulani J (2006) The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurochem* 97: 846-856

Antkiewicz-Michaluk L, Ossowska K, Romańska I, Michaluk J, Vetulani J (2008) 3-Methoxytyramine, an extraneuronal dopamine metabolite plays a physiological role in the brain as an inhibitory regulator of catecholaminergic activity. *Eur J Pharmacol* 599: 32-35

Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A, Romańska I, Bojarski A, Michaluk J (2011) Both stereoselective (R)- and (S)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline enantiomers protect striatal terminals against rotenone-induced suppression of dopamine release. *Neurotox Res* 20(2): 134-149

Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A, Michaluk J (2014) 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, an Endogenous Amine with Unexpected Mechanism of Action: New Vistas of Therapeutic Application *Neurotoxicity Research*. 25 (1): 1-12

Arya DK (1994) Extrapyramidal symptoms with selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Psychiat* 165:728-733

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306

Brown AS, Gershon S (1993) Dopamine and depression. *J Neural Transm Gen Sect* 91(2-3):75-109

Burns RS, Lewitt PA, Ebert H, Pakkenberg H, Kopin IJ (1985) The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* 312:1418-1421

Byrum CE, Ahearn EP, Krishnan KR (1999) A neuroanatomic model for depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 23: 175-193

Cadet JL, Brannock C (1998) Free radicals and pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 32:117-131

Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5:77-82

- Colpaert FC (1987) Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 26:1431-1440
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (2005) Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacol* 182: 335-344
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain:IL Patterns of loss of the dopamine-containing neurons in the Parkinson's disease. *Brain* 122(8):1437-1448
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol. (Berl.)* 121: 66-72
- Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL (1996) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 271(13):7273-7276
- Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L, McCormack TA, Melandri FD, Nunes SL, Palombella VJ, Parent LA, Plamondon L, Stein RL (1997) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem* 272(3):182-188
- Egan MF, Karoum F, Wyatt RJ (1991) Effects of acute and chronic clozapine and haloperidol administration on 3-methoxytyramine accumulation in the rat prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Eur J Pharmacol* 199: 191-199
- Elhwuegi AS (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:435-451
- Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N (2003) Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1619:39-52
- Fernandes VS, SantosJR, Leao A, Medeiros A, Melo TG et al.(2012) Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 231:154-163
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Ruffoli R, Soldani P, Ruggieri S, Alessandri MG, Paparelli A (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci* 23:8955-8966

Gerlach M, Riederer P (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103:987-1041

Grunewald GL, Reitz TJ, Ruth JA, Vollmer S, Eiden LE, Rutledge CO (1979) Inhibition of neuronal uptake of 3H-biogenic amines into rat cerebral cortex by partially and fully saturated derivatives of imipramine and desipramine. The importance of the aromatic ring in adrenergic amines--part 3. *Biochem Pharmacol* 28: 417-421

Gutman M, Singer TP, Beinert H, Casida JE (1970) Reaction sites of rotenone, piericidin A, and amytal in relation to the nonheme iron components of NADH dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 65:763-770

Hattoria N, Wanga M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S, Mochizuki H (2009) Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15(Suppl 1):35-38

Horgan DJ, Singer TP, Casida JE (1968) Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. 13. Binding sites of rotenone, piericidin A, and amytal in the respiratory chain. *J Biol Chem* 243:834-843

Javaid JI, Pere IJM, Davis JM (1979) Inhibition of biogenic amines uptake by imipramine, desipramine, 2 OH-imipramine and 2 OH-desipramine in rat brain. *Life Sci* 24: 21-28

Kalia LV, Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet* 386:896-912

Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF (1994) 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in frontal cortex, nucleus accumbens and striatum by a simple two pool model. *J Neurochem* 63: 972-978

Kikuchi K, Nagatsu Y, Makino Y, Mashino T, Ohta S, Hirobe M (1991) Metabolism and penetration through blood-brain barrier of parkinsonism-related compounds 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *Drug Metab Dispos* 19: 257-262

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608

Kitamura Y, Kitagawa K, Kimoto S, Sagara H, Shibata K, Kawasaki H, Sendo T, Gomita Y (2008)

Selegilin exerts antidepressant-like effects during the forced swim test in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *J Pharmacol Sci* 106: 639-644

Kohno M, Ohta S, Hirobe M (1986) Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline as novel endogenous amines in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 140:448-454

Konieczny J, Lenda T, Czarnecka A (2016) Early increase in dopamine release in the ipsilateral striatum after unilateral intranigral administration of lactacystin produces spontaneous contralateral rotations in rat. *Neurosci* 324:92-106

Kotake Y, Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M. (1995) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. *J Neurochem*. Dec;65(6):2633-8

Kotake Y, Yoshida M, Ogawa M, Tasaki Y, Hirobe M, Ohta S (1996) Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci Lett* 217:69-71

Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395(6701):451-452

Lorenc-Koci E, Ossowska K, Wardas J, Wolfarth S (1995) Does reserpine induce parkinsonian rigidity? *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 9:211-223

Lorenc-Koci E, Lenda T, Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, Domin H, Śmiałowska M, Konieczny J (2011) 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* 58:839-849

Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T (1989) Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33:267-277

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Leunis JC (2008) An IgM-mediated immune response directed against nitro-bovine serum albumin (nitro-BSA) in chronic fatigue syndrome (CFS) and major depression: evidence that nitrosative stress is another factor underpinning the comorbidity between major depression and CFS. *29(3): 313-319*

Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G et al. (2009) The inflammatory and neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 24(1): 27-53

Makino Y, Ohta S, Tachikawa O, Hirobe M (1988) Presence of tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in foods: compounds related to Parkinson's disease. *Life Sci* 43:373-8

Marey-Semper I, Gelman M, Levi-Strauss M (1993) The high sensitivity to rotenone of striatal dopamine uptake suggests the existence of a constitutive metabolic deficiency in dopaminergic neurons from the substantia nigra. *Eur J Neurosci* 5:1029-1034

Maruyama W, Naoi M, Kasamatsu T, Hashizume Y et al. (1997) An endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl-(R)-salsolinol, induces DNA damage in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 69:322-329

McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S et al. (1998) Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the etiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 56:921-933

McNaught KS, Jenner P (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 297:191-194

McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2002) Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *NeuroReport* 13:1437-1441

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:149-162

Miller J, Selhub J, Joseph J (1996) Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autooxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med* 21:241-249

Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG (1999) Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci* 20:424-429

Miura H, Naoi M, Nakahara D, Ohta T, Nagatsu T (1996) Effects of moclobemide on forced-swimming stress and brain monoamine levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 469-475

Nagatsu T, Yoshida M (1988) An endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline, produces parkinsonism in primates with decreased dopamine, tyrosine hydroxylase and biopterin in the nigrostriatal regions. *Neurosci Lett* 87:178-182

- Nagatsu T (1997) Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res* 29:99-111
- Naoi M, Matsuura S, Parvez H, Takahashi T et al. (1989a) Oxidation of N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into the N-methylisoquinolinium ion by monoamine oxidase. *J Neurochem* 52:653-655
- Naoi M, Matsuura S, Takahashi T, Nagatsu T (1989b) An N-methyltransferase in human brain catalyses N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of a dopaminergic neurotoxin N-methylisoquinolinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 161:1213-1219
- Naoi M, Maruyama W, Niwa T, Nagatsu T (1994) Novel toxins and Parkinson's disease: N-methylation and oxidation as metabolic bioactivation of neurotoxin. *J Neural Transm Suppl* 41:197-205
- Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Kohda K et al. (1996) A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)-salsolinol a precursor of the dopaminergic neurotoxin, N-methyl-(R)-salsolinol. *Neurosci Lett* 212:183-186
- Newberg, A.B., Amsterdam J.D., Shults, J., 2007. Dopamine transporter density may be associated with the depressed affect in healthy subjects. *Nucl. Med. Commun.* 28, 3-6.
- Niwa T, Takeda N, Kaneda N, Hashizume Y, Nagatsu T (1987) Presence of tetrahydroisoquinoline and 2-methyl-tetrahydroisoquinoline in parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 1084-1089
- Niwa T, Takeda N, Sasaoka T, Kaneda N et al (1989) Detection of tetrahydroisoquinoline in parkinsonian brain as an endogenous amine by use gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 491:397-403
- Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Kawada Y, Yamamoto M, Mori A (1994) Differential effects of chronic L-DOPA treatment on lipid peroxidation in the mouse brain with or without pretreatment with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Lett* 17:55-58
- Ohta S, Kohno M, Makino Y, Tachikawa O, Hirobe M (1987) Tetrahydroisoquinoline and 1-methyltetrahydroisoquinoline are present in the human brain: relation to Parkinson's disease. *Biomed Res* 8, 453-456.

Okada T, Shimada S, Sato K, Kotake Y, Kawai H, Ohta S, Tohyama M, Nishimura T (1998) Tetrahydropapaveroline and its derivatives inhibit dopamine uptake through dopamine transporter expressed in HEK293 cells. *Neurosci Res* 30: 87-90

Patsenka A, Antkiewicz-Michaluk L (2004) Inhibition of rodent brain monoamine oxidase and tyrosine hydroxylase by endogenous compounds - 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline alkaloids. *Pol J Pharmacol* 56; 727-734

Pedrosa R, Soares-da-Silva P (2002) Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *Br J Pharmacol* 137:1305-1313

Pietraszek M, Michaluk J, Romańska I, Wąsik A, Gołębiewska K, Antkiewicz-Michaluk L (2009) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline antagonizes a rise in brain dopamine metabolism, glutamate release in frontal cortex and locomotor hyperactivity produced by MK-801 but not the disruptions of prepulse inhibition, and impairment of working memory in rat. *Neurotox Res* 16: 390-407

Renard CE, Daily E, David DJ, Hascoet M, Bourin M (2003) Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol* 17(4):449-455

Rogers MA, Bradshaw JL, Pantelis C, Philips JG (1998) Frontostriatal deficits in unipolar major depression. *Brain Res Bull* 47: 297-310

Rommelspacher H, Susilo R (1985) Tetrahydroisoquinolines and β -carbolines: putative natural substances in plants and mammals. *Prog Drug Res* 29:415-459

Rung JP, Rung E, Johanson AM, Svenson K, Carlsson A, Carlsson ML (2011) Effects of the dopamine stabilizers (S)-(-)-OSU6162 and ACR16 on prolactin secretion in drug-naïve and monoamine-depleted rats. *Nauryn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384:39-45

Sachs C, Jonson G (1975) Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* 24:1-8

Sanghavi CR, Barhate SA, Mahajan MS, Mohan M, Kasture SB (2011) Korean ginseng extract attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and improves cognitive dysfunction in rats. *Nat Prod Res* 25:704-715

Scapagnini G, Davinelli S, Drago F, De Lorenzo A, Oriani G (2012) Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? *CNS Drugs* 26: 477-490

Shah PJ, Ogilvie AD, Goodwin GM, Ebmeier KP (1997) Clinical and psychometric correlates of dopamine D-2 binding in depression. *Psychol Med* 27: 1247-1256

Shavali S, Ebadi M (2003) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ), an endogenous neurotoxin, induces dopaminergic cell death through apoptosis. *Neurotoxicology* 24: 417-424

Shavali S, Carlson E C, Swinscoe J C, Ebadi M (2004) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a Parkinsonism-inducing endogenous toxin, increases α -synuclein expression and causes nuclear damage in human dopaminergic cells. *J Neurosci Res* 76: 563-572

Spencer JPE, Jenner A, Butler J, Aruoma OI, Dexter DT, Jenner P, Halliwell B (1996) Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Res* 24:95-105

Suzuki T, Fujita S, Narimatsu S, Masubuchi Y et al. (1992) Cytochrome P450 isoenzymes catalyzing 4-hydroxylation of parkinsonism-related compound 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in rat liver microsomes. *FASEB J* 6:771-776

Tanaka K, Ogawa N (2005) Dopamine agonist cabergoline inhibits levodopa-induced caspase activation in 6-OHNA-lesioned mice. *Neurosci Res* 51:9-13

Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT (2005) Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol* 134:109-118

Uhl GR (1998) Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 43:555-560

Versiani M, Oggero U, Alterwain P, Capponi R, Dajas F, Heinze-Martin G, Marquez CA, Poleo MA et al. (1989) A double-blind comparative trial of moclobemide v. imipramine and placebo in major depressive episodes. *Br J Psychiatry* 6: 72-77

Vetulani J, Antkiewicz-Michaluk L, Nalepa I, Sansone M (2003) A possible physiological role for cerebral tetrahydroisoquinolines. *Neurotox Res* 5: 147-156

Wąsik A, Romańska I, Antkiewicz-Michaluk L (2009) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous parkinsonism-inducing toxin, strongly potentiates MAO-dependent dopamine oxidation and impairs dopamine release: ex vivo and in vivo neurochemical studies. *Neurotox Res* 15: 23-31

Wąsik A, Romańska I, Michaluk J, Antkiewicz-Michaluk L (2012) Comparative behavioral and neurochemical studies of R- and S-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline stereoisomers in the rat. *Pharmacol Rep* 64(4): 857-869

Wąsik A, Możdżeń E, Romańska I, Michaluk J, Antkiewicz-Michaluk L (2013) Antidepressant-like activity of the endogenous amine, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the behavioral despair test in the rat, and its neurochemical correlates: a comparison with the classical antidepressant, imipramine. *Eur J Pharmacol* Jan 30;700(1-3):110-7

Wąsik A, Kajta M, Lenda T, Antkiewicz-Michaluk L (2014) Concentration-dependent opposite effects of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on markers of apoptosis: in vitro and ex vivo studies. *Neurotox Res* 25: 90-99

Wąsik A, Romańska I, Michaluk J, Kajta M, Antkiewicz-Michaluk L (2014) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an Endogenous Neurotoxic Compound, Disturbs the Behavioral and Biochemical Effects of L-DOPA: In Vivo and Ex Vivo Studies in the Rat. *Neurotoxicity Research* volume 26 number 3, 240-254

Wąsik A, Możdżeń E, Michaluk J, Romańska I, Antkiewicz-Michaluk L (2014) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous Neuroprotectant and MAO inhibitor with antidepressant-like properties in the rat. *Neurotoxicity Research* volume 25 number 4, 323-334

Wąsik A, Polak D, Romańska I, Michaluk J, Antkiewicz-Michaluk L (2016) The impact of 1MeTIQ on the function of dopaminergic system in 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Pharmacological Rep*, Dec 13;68(6):1205-1213. doi: 10.1016/j.pharep.2016.08.004

Wąsik A, Romańska I, Michaluk J, Zelek-Molik A, Nalepa I, Antkiewicz-Michaluk L (2016) Neuroprotective Effect of the Endogenous Amine 1MeTIQ in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 29(3):351-363

Xie W, Li X, Li C, Zhu W, Jankovic J, Le W (2010) Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 115:188-199

Yamakawa T, Kotake Y, Fujitani M, Shintani H, Makino Y, Ohta S (1999) Regional distribution of parkinsonism-preventing endogenous tetrahydroisoquinoline derivatives and an endogenous parkinsonism-preventing substance-synthesizing enzyme in monkey brain. *Neurosci Lett* 276: 68-70

Yamakawa T, Ohta S (1999) Biosynthesis of a parkinsonism-preventing substance, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, is inhibited by parkinsonism-inducing compounds in rat brain mitochondrial fraction. *Neurosci Lett* 259: 157-160

Youdim MB, Bakhle YS (2006) Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Brit J Pharmacol* 147: 287-296

Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7: 295-309

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

3.1 Inne realizowane tematy badawcze

3.1.1 Przeciwwzależnieniowy potencjał endogennych amin z grupy tetrahydroizochinoliny

Pracę naukową rozpocząłam w październiku 2003 roku jako słuchacz Studium Doktoranckiego utworzonego przez Instytut Farmakologii PAN w Krakowie. Wcześniej, w latach 1994 – 2003 pracowałam jako nauczyciel biologii w VI LO w Sosnowcu i nie miałam do czynienia z pracą naukową. W trakcie studiów doktoranckich zajmowałam się badaniem roli endogennych związków z grupy 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny w mechanizmie działania morfiny, kokainy i amfetaminy. W tym czasie zbadaliśmy przeciwwzależnieniowy potencjał 1MeTIQ oraz TIQ. W testach behawioralnych sprawdziliśmy jaki wpływ mają 1MeTIQ i TIQ na analgezję morfinową, rozwój tolerancji, ekspresję syndromu abstynencji morfinowej oraz zmiany aktywności lokomotorycznej po podaniu różnych związków psychoaktywnych takich jak kokaina czy amfetamina [Wąsik i wsp. 2007; Wąsik i wsp. 2010]. Wykazaliśmy, że 1MeTIQ blokuje behawioralne efekty związane z działaniem substancji uzależniających takie jak:

- rozwój tolerancji morfinowej
- syndrom abstynencji morfinowej
- sensytyzację kokainową
- hyperaktywność amfetaminową

W badaniach biochemicznych *ex vivo* wykonanych przy użyciu chromatografii wysokociśnieniowej z elektrochemiczną detekcją (HPLC ED) wykazaliśmy, że 1MeTIQ (50 mg/kg i.p.) antagonizuje indukowany przez morfinę i kokainę wzrost szybkości metabolizmu dopaminy. Jednocześnie związek ten przestrasza katabolizm dopaminy z drogi oksydacji na drogę o-metylacji, co ma bardzo korzystny wpływ na funkcjonowanie neuronów dopaminowych w OUN. W badaniach *in vivo* wykonanych metodą mikrodializy wykazaliśmy, że 1MeTIQ podany łącznie z substancjami uzależniającymi (morfina, kokaina, amfetamina) potęgował wywołany ich podaniem wzrost stężenia dopaminy w szczelinie synaptycznej, ale równocześnie powodował wielokrotnie większy od dopaminy wzrost stężenia 3-MT w przestrzeni pozakomórkowej. W

kolejnych badaniach potwierdziliśmy również rolę 3-MT jako hamującego regulatora aktywności układu dopaminowego [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2008]. Przeciwwzależnieniowy profil działania 1MeTIQ jest związany z jego oryginalnym wpływem na aktywność układu dopaminowego: z jednej strony jako regulatora pozytywnego, związanego z hamowaniem MAO i podnoszeniem stężenia dopaminy w mózgu; ale z drugiej, wykazującego także działanie antagonistyczne poprzez 3-MT.

3.1.2 Ocena neuroprotekcynnego potencjału 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ) badanego w różnych zwierzęcych modelach choroby Parkinsona

Po obronie dysertacji zostałam zatrudniona na stanowisku Asystenta w Zakładzie Neurochemii, a moje zainteresowania naukowe pozostały w kręgu badań nad właściwościami i mechanizmem działania związków z grupy tetrahydroizochinoliny. Ze względu na specyficzny profil działania, 1MeTIQ rokował duże nadzieje jako związek neuroprotekcynny dlatego rozpoczęliśmy szereg eksperymentów mających na celu sprawdzenie tej hipotezy. Wyniki badań *in vitro* wskazują na neuroprotekcynne działanie 1MeTIQ na komórki ziarniste mózdzku traktowane glutaminianem. Ponadto 1MeTIQ całkowicie antagonizuje toksyczne efekty wywołane przez kainian [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2006]. Dzięki tym eksperymentom wykazaliśmy, że 1MeTIQ ma zdolność blokowania receptora NMDA i w ten sposób hamuje nadmierne pobudzenie systemu glutamatergicznego w OUN. Także w badaniach *in vivo* i *ex vivo* potwierdziliśmy wpływ 1MeTIQ na układ glutamatergiczny. W tych eksperymentach 1MeTIQ całkowicie antagonizował hyperaktywność oraz wzrost uwalniania glutaminianu indukowane przez MK-801 [Pietraszek i wsp. 2009]. Ponadto wykazaliśmy, że oba enancjomery (R-) i (S)-1MeTIQ chronią neurony dopaminowe przed uszkodzeniem wywołanym przez rotenon [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2011]. Zastosowanie 1MeTIQ w modelu rezerpinowym także ma działanie neuroprotekcynne [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2015]. Dane uzyskane w kolejnych eksperymentach *ex vivo* i *in vivo* wskazują, że chroniczne iniekcje 1MeTIQ zapobiegają toksycznym efektom wywołanym przez 1BnTIQ [Wąsik i wsp. 2016A, Wąsik i wsp. 2016B]. Mechanizmem odpowiedzialnym za neuroprotekcynne efekty 1MeTIQ, zarówno w modelu rotenonowym, rezerpinowym jak i 1BnTIQ, jest jego zdolność do hamowania aktywności MAO oraz zmiatania wolnych rodników, co przekłada się na obniżenie stresu oksydacyjnego w neuronach dopaminowych. Tak więc, 1MeTIQ jest odwracalnym inhibitorem receptorów NMDA oraz enzymów MAO_A i MAO_B biorących udział w metabolizmie monoamin (dopaminy, noradrenaliny i serotoniny). Takie szerokie i modulujące działanie 1MeTIQ ma bardzo korzystny wpływ na funkcjonowanie szeregu systemów neuroprzekaźnikowych w mózgu.

3.1.3 Badania toksycznych efektów salsolinolu

Równoległe z badaniami nad neuroprotekcynnym potencjałem 1MeTIQ prowadziliśmy eksperymenty wyjaśniające toksyczne działanie innych związków z grupy tetrahydroizochinoliny, takich jak salsolinol. Badania *in vitro* przeprowadzone na pierwotnych kulturach komórek hipokampa dowodzą, że salsolinol dawkozależnie wpływa na markery apoptozy. W wysokim stężeniu, 500µM związek ten zwiększa aktywność kaspazy-3 oraz ilość uwalnianego LDH.

Ponadto wywołuje spadek mitochondrialnego potencjału membranowego [Możdżeń i wsp. 2015]. Z kolei w badaniach *in vivo* wykazaliśmy, że chroniczne iniekcje salsolinolu całkowicie antagonizują efekty L-DOPA, tzn. hamują hyperaktywność oraz uwalnianie dopaminy do przestrzeni pozakomórkowej indukowane przez L-DOPA [Wąsik i wsp. 2015]. Uzyskane przez nas wyniki dowodzą, że zwiększone stężenie salsolinolu w mózgu może doprowadzić do śmierci neuronów dopaminowych na drodze apoptozy oraz silnie ogranicza efektywność działania L-DOPA, która jest standardowym lekiem stosowanym w chorobie Parkinsona.

3.1.4 *Badania przeciwdepresyjne TIQs przy zastosowaniu zwierzęcych modeli depresji*

Wyniki naszych badań dowodzą, że chroniczne iniekcje TIQ hamują objawy depresji u szczurów poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu (CMS): zwiększają spożycie cukrozy oraz skracają czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (FST) [Możdżeń i wsp. 2014]. Przeciwdepresyjne właściwości TIQ są związane z aktywacją systemów monoaminergicznych (dzięki hamowaniu aktywności MAO oraz wychwytu dopaminy). W kolejnych eksperymentach zbadaliśmy także przeciwdepresyjne właściwości TIQ i 1MeTIQ przy zastosowaniu modelu rezerpinowego. Jak wiadomo rezerpina jest neurotoksyną powodującą wypłukanie monoamin z pęcherzyków synaptycznych. Zastosowanie chronicznych iniekcji niskiej dawki rezerpiny wywołuje objawy depresyjne u zwierząt. W naszych badaniach zarówno TIQ jak i 1MeTIQ odwracały pro-depresyjne efekty rezerpiny tzn. skracali czas bezruchu w FST oraz normalizowały ilość dopaminy, noradrenaliny i serotoniny w poszczególnych strukturach mózgu szczura [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2014]. Zbadaliśmy także przeciwdepresyjny potencjał 1MeTIQ w modelu klonidynowym. Klonidyna jest agonistą receptorów adrenergicznych α_2 i stosowanie jej wywołuje objawy depresyjne u pacjentów. W naszych badaniach 1MeTIQ całkowicie odwracał prodepresyjne efekty klonidyny, skracając czas bezruchu szczurów w FST. Natomiast badania neurochemiczne potwierdzają, że klonidyna wywołuje depresję układów monoaminergicznych a efekty te są antagonizowane przez iniekcje 1MeTIQ [Antkiewicz-Michaluk i wsp. 2017]; Przeciwdepresyjne właściwości TIQ i 1MeTIQ zostały także potwierdzone u myszy C57BL6J. Zarówno w teście wymuszonego pływania jak i teście zawieszenia za ogon oba badane związki skracali czas bezruchu myszy motywując je do wysiłku. Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach przeprowadzonych na szczurach, oba badane związki zwiększają aktywność systemów monoaminergicznych w mózgu myszy [Możdżeń i wsp. 2017]

3.1.5 *Badania we współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym i Uniwersytetem Medycznym w Lublinie*

W ramach współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie wykonaliśmy badania neurochemiczne *ex vivo*. W tym eksperymencie dokonaliśmy pomiaru zmian w poziomie dopaminy i jej metabolitów u szczurów w fazie odstawienia od morfiny oraz po otrzymaniu agonistów adenozynowych, CPA i CGS 21680. U szczurów w odstawieniu morfinowym zaobserwowano znamienne spadki poziomu dopaminy w prążkowie. Natomiast podanie agonistów adenozynowych zapobiegało tym spadkom dopaminy [Listos i wsp. 2016]. Natomiast we współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym wykazaliśmy także, że

zaburzenia funkcjonowania receptorów adenozynowych A1 w hipokampie zwiększa tolerancję morfinową u szczurów traktowanych ołowiem (Pb) w okresie neonatalnym [Baranowska-Bosiacka i wsp. 2016]

Piśmiennictwo:

8. Lucyna Antkiewicz-Michaluk, Jerzy Łazarewicz, Antoni Patsenka, Małgorzata Kajta, Elżbieta Ziemińska, Elżbieta Salińska, **Agnieszka Wąsik**, Krystyna Gołębiewska, Jerzy Vetulani. 2006. The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 97, 846-856 (IF: 4.260; MNiSW: 16)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowiec; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); Mój udział procentowy szacuję na 10%
9. **Agnieszka Wąsik**, Irena Romańska, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2007. The effect of an endogenous compound 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on morphine-induced analgesia, dependence and neurochemical changes in dopamine metabolism in rat brain structures". *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58, 2, 235-252 (IF: 4.466; MNiSW: 15)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; zbadaniu analgezji morfinowej, zbadaniu syndromu abstynencji morfinowej; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1,2,3,4,5a,5b; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%
10. Małgorzata Pietraszek, Jerzy Michaluk, Irena Romańska, **Agnieszka Wąsik**, Krystyna Gołębiewska, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2009. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline antagonizes a rise in brain dopamine metabolism, glutamate release in frontal cortex and locomotor hyperactivity produced by MK-801 but not the disruptions of prepulse inhibition, and impairment of working memory in rat. *Neurotoxicity Research*, 16: 390-407 (IF: 2.439 ; MNiSW: 24)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; Mój udział procentowy szacuję na 10%
11. **Agnieszka Wąsik**, Irena Romańska, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2010. An important role of 3-methoxytyramine in the inhibition of cocaine sensitization by 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: in vivo microdialysis study. *Pharmacological Reports Vol.62(6)* (IF: 2.500; MNiSW: 27)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowiec; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1,2a,2b,2c,2d,3a,3b,3c,3d,4a,4b; interpretacji

wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%

12. Lucyna Antkiewicz-Michaluk, **Agnieszka Wąsik**, Irena Romańska, Andrzej Bojarski, Jerzy Michaluk. 2011. Both Stereoselective (R)- and (S)- 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Enantiomers Protect Striatal Terminals Against Rotenone-Induced Suppression of Dopamine Release. *Neurotoxicity Research* volume 20 number 2, 134-149 (IF: 3.514; MNiSW: 32)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 3a,3b,4a,4b,5a,5b,6,7; interpretacji wyników; Mój udział procentowy szacuję na 40%

13. Edyta Możdżeń¹, Mariusz Papp², Piotr Gruca², **Agnieszka Wąsik**³, Irena Romańska³, Jerzy Michaluk³, Lucyna Antkiewicz-Michaluk³. 2014. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline produces an antidepressant-like effect in the force swim test and chronic mild stress model of depression in the rat: Neurochemical correlates *Eur. J Pharmacol* Apr 15;729:107-15 (IF: 2.532; MNiSW: 30)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości oraz FST; narysowaniu rycin 2a,2b,2c,5; Mój udział procentowy szacuję na 20%

14. Lucyna Antkiewicz-Michaluk, **Agnieszka Wąsik**, Edyta Możdżeń, Irena Romańska, Jerzy Michaluk. 2014. Antidepressant-like Effect of Tetrahydroisoquinoline Amines in the Animal Model of Depressive Disorder Induced by Repeated Administration of a Low Dose of Reserpine: Behavioral and Neurochemical Studies in the Rat. *Neurotoxicity Research* volume 26 number 1, 85-98 (IF: 3.538; MNiSW: 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości oraz FST; narysowaniu rycin 2a,2b,2c,3a,3b,4a,4b,4c; Mój udział procentowy szacuję na 20%

15. Lucyna Antkiewicz-Michaluk, **Agnieszka Wąsik**, Edyta Możdżeń, Irena Romańska, Jerzy Michaluk. 2015. Withdrawal from repeated administration of a low dose of reserpine induced opposing adaptive changes in the noradrenaline and serotonin system function: a behavioral and neurochemical ex vivo and in vivo studies in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2015, 57:146-154 (IF: 4.361; MNiSW: 35)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości, FST oraz mikrodializy; narysowaniu rycin 1a,1b,1c,2a,2b,4a,4b,4c; Mój udział procentowy szacuję na 40%

16. Edyta Możdżeń, Małgorzata Kajta, **Agnieszka Wąsik**, Tomasz Lenda, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2015. Salsolinol, an endogenous triggers a two-phase opposing action in the central nervous system. *Neurotoxicity Research* 2015 Apr;27(3):300-13 (IF: 3.140; MNiSW: 25)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; narysowaniu rycin 2a,2b,3,5,6,7a,7b; interpretacji wyników; Mój udział procentowy szacuję na 15%
17. **Agnieszka Wąsik**, Irena Romańska, Jerzy Michaluk , Lucyna Antkiewicz-Michaluk 2015. Chronic salsolinol administration prevents the behavioral and neurochemical effects of L-DOPA in rat. *Neurotoxicity Research* May;27(4):399-410 (IF: 3.140; MNiSW: 25)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowie; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,2a,2b; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%
18. **Agnieszka Wąsik** , Irena Romańska , Jerzy Michaluk , Agnieszka Zelek-Molik, Irena Nalepa, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2016. Neuroprotective effect of the endogenous amine 1MeTIQ in an animal model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* Apr;29(3):351-63 (IF: 3.140; MNiSW: 25)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,2a,2b,3a,3b; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%
19. Listos Joanna, Baranowska-Bosiacka Irena, **Wąsik Agnieszka**, Talarek Sylwia, Tarnowski Maciej, Listos Piotr, Łupina Małgorzata, Antkiewicz-Michaluk Lucyna, Gutowska Izabela, Tkacz Marta, Pilutin Anna, Orzelska Jolanta, Chlubek Dariusz, Fidecka Sylwia. 2016. The adenosinergic system is involved in sensitization to morphine withdrawal signs in rats – neurochemical and molecular basis in dopaminergic system. *Psychopharmacology*, 233:2383-2397 DOI 10.1007/s00213-016-4289-7 (IF: 3.540; MNiSW: 35)
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: wykonaniu pomiaru poziomu dopaminy i jej metabolitów przy wykorzystaniu metody HPLC; wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników neurochemicznych; interpretacji wyników neurochemicznych. Mój udział procentowy szacuję na 10%
20. Baranowska-Bosiacka Irena, Listos Joanna, Gutowska Izabela, Machoy-Mokrzyńska Anna, Kolasa-Wołoskiuk Agnieszka, Tarnowski Maciej, Puchałowicz Kamila, Prokopowicz Adam, Talarek Sylwia, Listos Piotr, **Wąsik Agnieszka**, Chlubek Dariusz. 2016. Effects of perinatal exposure to lead (Pb) on purine receptor expression in the brain and gliosis in rats tolerant to morphine analgesia. *Toxicology*. Jan 2;339:19-33. doi: 10.1016/j.tox.2015.10.003. (IF: 3.817; MNiSW: 40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: analizie merytorycznej otrzymanych wyników i pomocy w ich interpretacji. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

- 21. Agnieszka Wąsik, Irena Romańska and Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2016. Comparison of the Effects of Acute and Chronic Administration of Tetrahydroisoquinoline Amines on the In Vivo Dopamine Release: A Microdialysis Study in the Rat Striatum. Neurotoxicity Research 30(4), 648-657 DOI:10.1007/s12640-016-9661-1 (IF: 3.140; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu eksperymentów; iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu operacji stereotaktycznych w celu implantacji kaniul do prążkowiec; przeprowadzeniu eksperymentu mikrodializy (pobranie dializatu); wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników; narysowaniu rycin 1a,1b,2a,2b,3a,3b,4a,4b,5a,5b; interpretacji wyników; napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%

- 22. Edyta Możdżeń, Agnieszka Wąsik, Irena Romańska, Jerzy Michaluk, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2017. Antidepressant-like effect of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and its methyl derivative in animal models of depression. Pharmacological Rep 8;69(3):566-574 (IF: 2.251; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu bezruchu podczas testu FST; wykonaniu pomiaru czasu bezruchu podczas testu TST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości, FST oraz TST; Mój udział procentowy szacuję na 20%

- 23. Lucyna Antkiewicz-Michaluk, Irena Romańska, Agnieszka Wąsik, Jerzy Michaluk. 2017. Antidepressant-like effect of an endogenous neuroprotective amine, 1MeTIQ In clonidine-induced depression: the behavioral and neurochemical studies in rats. Neurotox Res DOI: 10.1007/s12640-017-9715-z. (IF: 3.140; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru czasu pływania podczas testu FST; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości oraz FST; Mój udział procentowy szacuję na 20%

- 24. Zofia Rogóż, Agnieszka Wąsik, Elżbieta Lorenc-Koci. 2017. Combined treatment with aripiprazole and antidepressants reversed the MK-801-induced positive and cognitive symptoms of schizophrenia in mice. Pharmacol Rep praca wysłana do recenzji (IF: 2.251; MNiSW: 25)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: iniekcjach dootrzewnowych badanych związków; wykonaniu pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt; wykonaniu analizy statystycznej z testu ruchliwości; Mój udział procentowy szacuję na 15%

3.2 Prace przeglądowe

1. Lucyna Antkiewicz-Michaluk , **Agnieszka Wąsik** , Jerzy Michaluk. 2014. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine with unexpected mechanism of action: new vistas of therapeutic application. Neurotox Res Jan;25(1):1-12 Impact factor: 3.538
2. Karolina Dec, Agnieszka Łukomska Dominika Maciejewska, Jakubczyk K, Irena Baranowska-Bosiacka, Dariusz Chlubek, **Agnieszka Wąsik** , Izabela Gutowska. 2016. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. Biol Trace Elem Res Oct 27 DOI:[10.1007/s12011-016-0871-4](https://doi.org/10.1007/s12011-016-0871-4) Impact Factor: 1.798
3. **Agnieszka Wąsik**, Lucyna Antkiewicz-Michaluk. 2017. The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. Pharmacol Rep DOI:[10.1016/j.pharep.2017.03.018](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.018) Impact factor: 2.251

Agnieszka Wąsik